

Wirkung einiger radioprotektiver und radiosensibilisierender Verbindungen auf die semikonservative und unprogrammierte DNA-Synthese von Rattenthymozyten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von Julian Winkle aus Albstadt
München 1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und
Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr.D.Hegner

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof.Dr.K.Tempel

**WIRKUNG EINIGER RADIOPROTEKTIVER UND RADIOSENSIBILISIERENDER
VERBINDUNGEN AUF DIE SEMIKONSERVATIVE UND UNPROGRAMMIERTE
DNA-SYNTHESE VON RATTENTHYMOZYTEN**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Julian Winkle
aus Altenstadt

München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Referent: Prof. Dr. K. Tempel

Korreferent: Prof. Dr. D. Giesecke

Tag der Promotion: 27. Februar 1981



INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. Problemstellung	1
2. Einleitung	2
2.1 Zur DNA-Synthese	2
2.1.1 Semikonservative DNA-Synthese	2
2.1.2 Reparaturvorgänge an der DNA	4
2.2 Biologische Wirkung von UV-Licht	8
2.3 Hydroxyharnstoff	9
2.4 Thiole und Aminothiole	10
2.5 "Elektronenaffine Substanzen" (N-Äthylmaleimid und Metronidazol)	13
2.6 Cytosinarabinosid	14
2.7 Ethidiumbromid	15
2.8 Bleomycin	16
2.9 Coffein	17
2.10 Diäthylldithiocarbamat	18
3. Material und Methodik	20
3.1 Reagentien und Tiermaterial	20
3.1.1 Reagentien und Lösungen	20
3.1.2 Tiermaterial	22
3.2 Versuchsablauf	23
3.2.1 Gewinnung der Thymus-Zellen	23
3.2.2 Beeinflussung der Thymozyten durch Reagentien und UV-Licht	24
3.2.3 Einbau von Methyl- ³ H-Thymidin	24
3.2.4 Weitere Verarbeitung der Zellen zur Bestimmung der in die DNA eingebauten ³ H-Aktivität	25
3.2.5 Messung der ³ H-Aktivität	25
3.2.6 Bestimmung der DNA-Konzentration	26
4. Ergebnisse	27
4.1 Versuche zur Methodik	27
4.1.1 Semikonservative DNA-Synthese (SDS) .	27
4.1.2 Unprogrammierte DNA-Synthese (UDS) ..	27
4.1.3 Verhalten der semikonservativen und unprogrammierten DNA-Synthese in Ab- hängigkeit vom pH-Wert	27

4.2	Wirkung und wirksame Konzentrationen einzelner Substanzen auf die semikonservative und unprogrammierte DNA-Synthese im Vorversuch	32
	AET	32
	Cystein	32
	L-Glutathion	33
	N-Äthylmaleimid	33
	Metronidazol	33
	Cytosinarabinosid	33
	Ethidiumbromid	33
	Bleomycin	33
	Coffein	33
	Diäthylthiocarbamat	33
4.3	Statistischer Nachweis der Wirkung einiger Substanzen auf die unprogrammierte DNA-Synthese	48
4.4	Wirkung von AET auf die UV-stimulierte UDS	50
4.5	Wirkung der Substanzen auf die unprogrammierte DNA-Synthese mit und ohne UV-Be- strahlung	52
	Cystein	52
	L-Glutathion	54
	N-Äthylmaleimid	55
	Metronidazol	57
	Cytosinarabinosid	58
	Ethidiumbromid	59
	Bleomycin	61
	Coffein	62
	Diäthylthiocarbamat	63
5.	Diskussion	66
5.1	Zur Methode	66
5.1.1	Zellmaterial	66
5.1.2	Thymidin-Pool	67
5.1.3	TdR- ³ H-Einbau in Gegenwart von Hydroxyharnstoff	68
5.1.4	Inkubationsbedingungen	69

	<u>Seite</u>
5.2 Zur Wirkung der untersuchten Substanzen	70
5.2.1 Aminothiole	72
5.2.2 Äthylmaleimid und Metronidazol	73
5.2.3 Cytosinarabinosid	74
5.2.4 Ethidium	75
5.2.5 Bleomycin	76
5.2.6 Coffein	76
5.2.7 Diäthylthiocarbamat	77
5.3 Schlußfolgerungen und Ausblick	78
6. Zusammenfassung	81
Summary	83
7. Literaturverzeichnis	85

Erklärung der verwendeten Abkürzungen

ADP	-	Adenosindiphosphat
AET	-	S-(2-Aminoäthyl)-isothiouroniumbromid-hydrobromid
AMP	-	Adenosinmonophosphat
araC	-	Cytosinarabinosid
ATP	-	Adosintriphosphat
BLM	-	Bleomycin
CDP	-	Cytidindiphosphat
CMP	-	Cytidinmonophosphat
Co	-	Coffein
CTP	-	Cytidintriphosphat
Cy	-	Cystein
d..	-	"desoxy"...
DDC	-	Diäthylthiocarbamat
DNA	-	Desoxyribonucleinsäure
EB	-	Ethidiumbromid
GDP	-	Guanosindiphosphat
GSH	-	L-Glutathion
GTP	-	Guanosintriphosphat
HU	-	Hydroxyharnstoff
IMP	-	Inosinmonophosphat
Met	-	Metronidazol
NEM	-	N-Äthylmaleimid
RNA	-	Ribonucleinsäure
RÖ	-	Röntgenbestrahlung
SDS	-	semikonservative DNA-Synthese
TDP	-	Thymidindiphosphat
TdR- ³ H	-	³ H-Methylthymidin
TMP	-	Thymidinmonophosphat
TTP	-	Thymidintriphosphat
UDS	-	unprogrammierte DNA-Synthese
UMP	-	Uridinmonophosphat
UV	-	Ultraviolettlicht bzw. Ultraviolettbestrahlung

1. Problemstellung

Zu den Grundeigenschaften lebender Zellen gehört ihre Fähigkeit zur Desoxyribonucleinsäure (DNA)-Reparatur. Eingriffe in dieses System ändern die zelluläre Reaktion gegenüber zahlreichen physikalischen und/oder chemischen Effektoren. Für Strahlenschutzstoffe beispielsweise wurde diskutiert, daß sie fördernd, für strahlensensibilisierende Verbindungen, daß sie hemmend in Reparaturvorgänge des Zellkerns eingreifen. Als experimenteller Beitrag zur Prüfung dieser Hypothese wurden vorliegend die semikonservative und die "unprogrammierte" (im englischen Sprachgebrauch "unscheduled" genannte) DNA-Synthese von Rattenthymozyten in vitro unter dem Einfluß einiger radioprotektiver und radiosensibilisierender Verbindungen untersucht. Die erstere Substanzgruppe umfaßte Aminothiole. Zur letzteren Gruppe gehörten Vertreter von elektronenaffinen Verbindungen, Antimetaboliten, interkalierenden Agentien sowie Bleomycin und ein Superoxiddismutase-Hemmstoff. In die Untersuchungen wurde auch Coffein einbezogen, da der Substanz sowohl radioprotektive als auch radiosensibilisierende Eigenschaften zugeschrieben werden.

2. Einleitung

Dem Verständnis der vorliegenden Arbeit mag es dienlich sein, zunächst mit einigen Worten an den Ablauf der semikonservativen und reparaturbedingten DNA-Synthese zu erinnern. Im Anschluß daran werden die Schädigung der DNA durch UV-Licht und die bisher behandelten Effekte der Substanzen charakterisiert, die im Zusammenhang mit den hier durchgeführten Untersuchungen zur Anwendung kamen.

2.1 Zur DNA-Synthese

2.1.1 Semikonservative DNA-Synthese (SDS)

(Übersichten s. unter Ziff. 12, 43, 61 des Literaturverzeichnis)

Die Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist diejenige Substanz, aus der die Erbfaktoren aufgebaut sind. Jeder einzelne Erbfaktor besitzt ein chemisches Äquivalent, gekennzeichnet durch eine bestimmte Basensequenz. Molekulare Grundlage der Vererbung ist ein "Wendeltreppenmolekül", bestehend aus zwei DNA-Strängen, die sich spiralförmig ineinander winden (Doppelhelix). Die Desoxyribonucleinsäuren sind Polynucleotide, deren monomere Bausteine aus 2-Desoxyribose, Phosphat und Purin- bzw. Pyrimidinbase bestehen. Die beiden Stränge sind durch Wasserstoffbrücken zwischen gegenüberliegenden Basen miteinander verknüpft, wobei im allgemeinen die Kombinationen Adenin-Thymin und Guanin-Cytosin auftreten. Die genetische Information (Code) ist durch Basentriplets bestimmt.

Die DNA ist bei den Eukaryonten vor allem im Zellkern lokalisiert. Zur Synthese der Desoxyribonucleinsäure werden u.a. die Triphosphate aller vier Nucleoside, DNA-Polymerasen, Ligasen, eine DNA als Matriz und ein kurzes Stück DNA oder RNA als Starter benötigt. Im Prinzip läuft die semikonservative DNA-

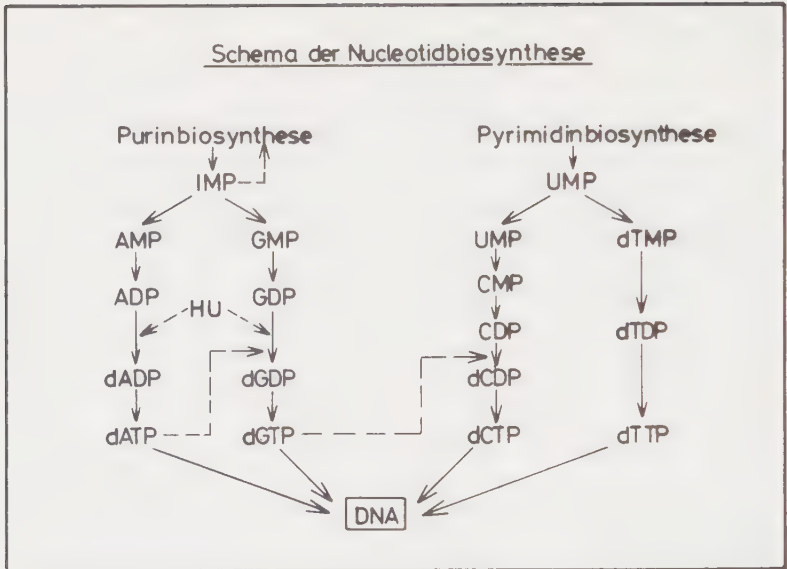
Synthese nach folgendem Schema ab:

1. Partielle Lösung der Basenpaare in der Eltern-DNA.
2. Die Doppelreihe öffnet sich zur Y-Figur. Nun dient jeder Einzelstrang als Matrice.
3. Die Nucleotide werden nach dem Prinzip der Basenkomplementarität ausgewählt und zum Makromolekül verknüpft.

Nach Abschluß der Replikation besteht jedes DNA-Molekül aus einem alten und einem neuen Strang. Die semikonservative DNA-Synthese ist also eine identische Reduplikation zur Weitergabe der genetischen Information.

Bei der Synthese der Desoxyribonucleotide werden zuerst die Nucleosidmonophosphate der Purin- bzw. Pyrimidinbasen synthetisiert. Für die Biosynthese der DNA werden jedoch die energiereichen Triphosphate aller vier Nucleoside (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) benötigt. Unter Mitwirkung entsprechender Kinasen werden die Monophosphate daher über die Diphosphatstufe in die entsprechenden Triphosphate umgewandelt, wobei für jeden Phosphorylierungsschritt ein Molekül ATP benötigt wird (Schema 1). Die Nucleosidphosphatsynthese unterliegt einer Selbstregulation, die dem Bedarf an Nucleosidphosphaten für die DNA-Synthese angepaßt ist (12).

Die Synthese der Purinnucleotide wird dabei über die allosterische Hemmung der Glutaminphosphoribosylpyrophosphat-Amido-transferase durch IMP (ATP, ADP) reguliert. Die Synthese der Pyrimidinnucleotide kann über einen Rückkopplungsmechanismus durch CTP gehemmt werden. Bei der Desoxyribonucleotidsynthese wirken dATP und dGTP als allosterische Inhibitoren der Reaktion $\text{GDP} \rightarrow \text{dGDP}$ bzw. $\text{CDP} \rightarrow \text{dCDP}$ und regulieren so durch Rückkopplung die DNA-Synthese (12).



Schema 1: Nucleotidbiosynthese

unterbrochene Linien: Rückkopplungsmechanismen bzw.
Hemmwirkung von Hydroxyharnstoff modifiziert nach
BUDECKE (12) Seite 97

2.1.2 Reparaturvorgänge an der DNA

(Übersichten s. unten Ziff. 12, 18, 102, 61 des
Literaturverzeichnisses)

Die Entwicklung des Lebens wäre ohne Mutation nicht möglich gewesen. Durch Mutation und Selektion entstanden während der Evolution aus einfachen Zellen mehrzellige Organismen - bis hin zum Menschen. Mutationen sind Änderungen des Erbgutes, die durch Mutagene, wie ionisierende Strahlen oder bestimmte chemische Effektoren, hervorgerufen werden.

Zu den primären Schäden an der DNA gehören:

1. Bruch der Phosphordiesterbindung
2. Bruch von Kovalentbindungen innerhalb eines Nukleotides (z.B. Alkylierung oder Hydroxylierung an einer Base)
3. Lösung von Wasserstoffbrücken
4. Bindungsbildung zwischen benachbarten Basen des gleichen Stranges
5. Cross-links (Brückenbildung) zwischen Basen gegenüberliegender Stränge
6. Intercalation (Einschieben eines Moleküls zwischen zwei DNA-Basenpaare).

Diese Primärereignisse können einseitig zum Tode oder zur Mutation der betroffenen Zellen führen, andererseits aber auch ohne biologische Konsequenzen bleiben, da die Zelle die Fähigkeit besitzt, Schäden zu reparieren. In Säugetierzellen ließen sich bisher drei Hauptreparaturmechanismen identifizieren:

1. Photoreaktivierung (photoreactivation)
2. Rekombinationsreparatur (post-replication repair) (Abb. 1)
3. Ausschnittsreparatur (excision repair) (Abb. 2)

Zusätzlich vermutet man noch weitere Reparaturmechanismen für Chromosomenbrüche und -umbauten.

Die Photoreaktivierung ist ein "Ein-Enzym-Prozeß", speziell bei UV-Schäden (Bildung von Basendimeren des gleichen Stranges).

Die Rekombinationsreparatur kann man sich als modifizierte DNA-Replikation vorstellen. Die Synthese der Tochter-DNA wird nur an den Schadstellen des Elternstranges blockiert. Es treten dort an der neusynthetisierten DNA Lücken (gaps)

bis zu einer Länge von 1000 Basen auf. Die Tochter-DNA hat dadurch ein geringeres Molekulargewicht.

Diese Lücken werden innerhalb weniger Stunden durch Rekombination und Kettenverlängerung geschlossen. Als Codeschablone dient entweder die Eltern- oder Tochter-DNA des Komplementärstranges (Abb. 1).

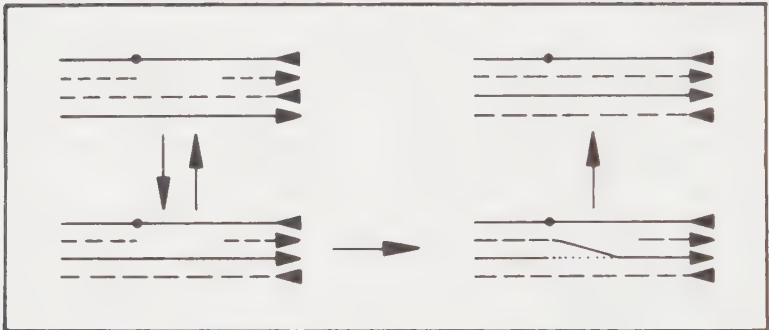


Abb. 1: Modell einer Rekombinationsreparatur
durchgehende Linie: Elternstrang-DNA
unterbrochene Linie: Tochterstrang-DNA
Punkt: Replikationsblock
nach STRAUSS (102) Seite 183, Fig. 4

Die Excisions-Reparatur wurde am genauesten untersucht. Sie kann die meisten Arten der Basenschäden reparieren. Unter Beteiligung mehrerer Enzyme (Glycosidase, Endonuclease, Polymerase, Exonuclease, Ligase) werden geschädigte Basen zunächst erkannt und mit einem mehr (UV) oder weniger (RÖ) großen Polynucleotidabschnitt herausgeschnitten; ein neuer Strangabschnitt wird anschließend synthetisiert und in die vorhandene DNA eingepaßt. Je nach Art der Schädigung scheinen zwei Wege der Ausschnittsreparatur zu existieren: Eine Nucleotid-Ausschnittsreparatur (nucleotide excision repair) und eine Basenausschnittsreparatur (base excision repair) (Abb. 2).

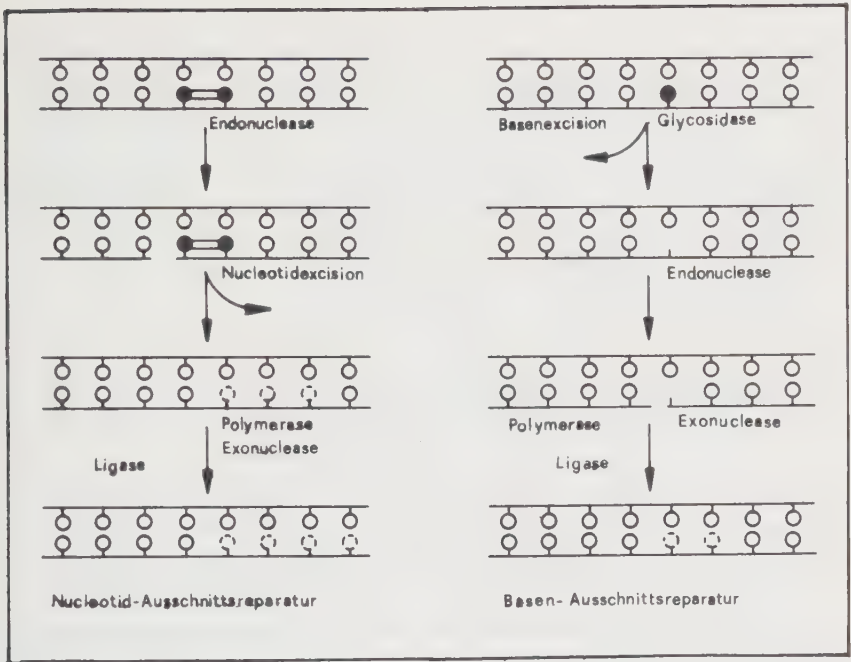


Abb. 2: Modell der Ausschnittsreparatur
nach STRAUSS (102) Seite 180, Fig. 1

Die Ausschnittsreparatur ist meistens die erste Reaktion der Zellen auf Schäden von Mutagenen. Sie kann mit verschiedenen Methoden untersucht werden, von denen hier die Ermittlung der geschädigten Basen (etwa durch Chromatographie), die Ermittlung der Strangbrüche (etwa durch Sedimentation einer DNA-Präparation im alkalischen Saccharosegradienten) und die Ermittlung der Einbaurrate von neuen Basen (etwa durch ^3H -Thymidineinbau) genannt seien.

Da beispielsweise der ^3H -Thymidineinbau bei der Ausschnittsreparatur in die DNA im allgemeinen weniger als 1 % der gesamten Inkorporationsrate beträgt, muß die semikonservative

DNA-Replikation (scheduled DNA synthesis, SDS) soweit wie möglich ausgeschaltet werden. Dies geschieht üblicherweise durch $(1 - 5) \times 10^{-3}$ mol/l Hydroxyharnstoff. Die Excisions-reparatur kann dann aus der unprogrammierten DNA-Synthese (unscheduled DNA synthesis, UDS) nach Abzug einer stets vorhandenen semikonservativen Restsynthese (Kontrollpopulation) abgeleitet werden.

2.2 Biologische Wirkung von UV-Licht

(Übersichten s. unten Ziff. 11, 25, 28, 41, 60, 82, 85, 108 des Literaturverzeichnis)

Eine Bestrahlung von Zellen mit UV-Licht (254 nm) verursacht an der DNA chemische und physikalische Schäden. Hohe Dosen (etwa $10 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$) hemmen die DNA-Synthese (in vitro) und können zum Tode der Zelle führen. Sein Eintreten hängt vor allem von der UV-Dosis, die die Zell-DNA erreicht und schädigt, der Kapazität des Zell-Reparaturvermögens und dem betreffenden Zyklusstadium ab.

Die tödliche Wirkung der UV-Bestrahlung auf Hela-Zellen beispielsweise ist am geringsten während der Mitose und am größten in der späten G_1 - bis frühen S-Phase.

Die bedeutsamste Wirkung von UV-Licht auf die DNA besteht in einer Dimerisation benachbarter Pyrimidinbasen (nicht aber Purinbasen), gelegentlich auch in der Bildung von "cross - links". Die physikalische Konsequenz ist eine Destabilisation der DNA-Doppelhelix, speziell derjenigen Strangabschnitte, die einen hohen Pyrimidinanteil aufweisen. Enthalten Elternstränge solche UV-Schäden, bleiben die polymerisierten Tochterstränge bei der Replikation kürzer als die der nicht bestrahlten DNA-Abschnitte. Eine solche Bildung von kürzeren Ketten ist nicht die Konsequenz einer reduzierten Kettenverlängerung, sondern hängt direkt mit dem Defekt des Eltern-

stranges zusammen. Die Kettenlänge der DNA-Tochterstränge verhält sich somit umgekehrt proportional zur UV-Dosis.

Die DNA-Replikation (bis zu einer Dosis von $15 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$) wird durch Bildung von Pyrimidindimeren auf die Dauer nicht blockiert.

Basendimere bedingen allerdings eine Beendigung der Transkription an der Schadstelle. Der Transskriptionsvorgang wird hinter dem Defekt wieder fortgeführt.

Die durch UV-Licht induzierten DNA-Schäden werden zum einen durch die Excisionsreparatur, zum anderen durch die Postreplikationsreparatur repariert.

2.3 Hydroxyharnstoff

Hydroxyharnstoff wurde 1863 von DRESLER und STEIN erstmals synthetisiert. YOUNG und HODAS entdeckten 1964 an Hela-Zellen seine Eigenschaft als Inhibitor der DNA-Synthese (84). Die Verbindung hemmt in vivo (Dosis etwa: 8 mg/kg) und in vitro (Konzentration etwa: 10^{-3} mol/l) die DNA-Synthese (84); RNA- und Proteinsynthese werden primär kaum beeinflusst. Die Substanz wurde zur Behandlung von Leukämie und Tumoren verwendet; Hydroxyharnstoff wirkt auch teratogen.

Die semikonservative DNA-Synthese wird durch Hydroxyharnstoff dadurch gehemmt, daß er das Ribonucleotid-Reduktase-System blockiert. Die Inaktivierung dieses Enzymsystems führt somit indirekt zu einer Entleerung des dGTP- und dATP-Pools (87) (Schema 1).

Die DNA-Reparatur kann durch Hydroxyharnstoff in höheren Konzentrationen (10^{-2} mol/l) einerseits gehemmt (21, 31), andererseits aber auch (unprogrammierte DNA-Synthese an Ovarzellen des Chinesischen Hamsters) stimuliert werden

(17). Unter Bedingungen metabolischer Aktivierung soll es zur Bildung von Wasserstoffperoxid aus Hydroxyharnstoff mit der Folge von Strangbrüchen kommen (4, 24).

Die an menschlichen Lymphozyten nachgewiesene Hemmung der DNA-Reparatur (106) wurde an Rattenthymozyten erst bei einer Hydroxyharnstoffkonzentration von mehr als 4×10^{-2} mol/l deutlich (103).

2.4 Thiole und Aminothiole

(Übersichten s. unter Ziff. 94, 95, 96, 97 des Literaturverzeichnis)

Thiole und Aminothiole gehören zu den klassischen "Strahlenschutzstoffen". Sie wurden 1965 von BACQ wie folgt definiert: "Chemical protectors (or radioprotectors) are substances which, administered to an animal or added to a culture medium shortly before exposure to ionizing radiation, decrease significantly the effects of this radiation; administration after irradiation is without favourable effect."

Das Prinzip des chemischen Strahlenschutzes wurde 1949 von HERVE und BACQ am Beispiel des Cyanids und von PATT für Cystein entwickelt. 1950 berichteten MOLE et al. über die Strahlenschutzwirksamkeit von Thioharnstoff. Innerhalb der nächsten Jahre wurden viele Strahlenschutzstoffe entdeckt, wobei sich zunächst das Hauptaugenmerk auf die SH-Gruppe richtete. Der Pharmakologe BACQ entdeckte 1952 die zusätzliche Bedeutung der NH_2 -Gruppe für den chemischen Strahlenschutz am Beispiel von Cysteamin (MEA, 2-Mercaptoäthylamin) und seinem Disulfid Cystamin. Weitere wichtige Stoffe waren das AET (S-(2-Aminoäthyl)-isothiouroniumbromid-hydrobromid) (1955) und Mexamin (1960); 1969 folgten die "WR-Substanzen", darunter als wichtigste das Cystaphos[®] (WR 638; Natrium-S-2-amino-äthyl -hydrogenthiophosphat) und Gammaphos[®] (WR 2721; S- 2 (3-Aminopropylamino) äthylidihydrogenthio-

phosphat). Zu den modernen chemischen Radioprotektoren gehören heute das Ixeprin (Disulfid des MPG, N- 2-Mercapto-propionyl -glycin von einer Gruppe um SANTHA) und das Ade-turon (v. NIKOLOV), das AET und ATP in einem Molekül vereinigt.

Ein einheitlicher Wirkungsmechanismus ist aus dem vorliegen-den, inzwischen kaum mehr überschaubaren Schrifttum (zusam-menfassende Übersichten: 6, 22, 37, 59, 94, 95, 96, 97) nur schwer ableitbar. Die wichtigsten, z.Zt. diskutierten Wir-kungsmechanismen sind im folgenden stichwortartig zusammen-gestellt:

1. Energie- und Ladungstransfer auf Schutzstoffe
nach Absorption der primären Strahlenenergie

2. Radikalfang

Abfang von Radikalen (wie $H^\bullet$, $OH^\bullet$, $HO_2^\bullet$) und reaktions-fähigen Zwischenprodukten (wie H_2O_2) und/oder Reaktion mit möglichen Radiotoxinen.

3. Reduktionswirkung

Reduktion der bei Bestrahlung in wäßrigem Milieu entste-henden oxydativ wirkenden Radikale anorganischer und organischer (Lipide) Art.

4. Ersatz

Unmittelbarer oder mittelbarer Ersatz von strahleninak-tivierten, essentiellen, insbesondere von nicht-protein-gebundenen, membranständigen SH-Gruppen.

5. Bildung gemischter Disulfide

Reversible Inaktivierung strahlenempfindlicher, zell-eigener SH-Gruppen mit der Möglichkeit, Radikale des Wassers, durch Radiolyse der -S-S-Bindung, abzufangen und Ladungen auf Bioradikale zu übertragen.

6. Endogene Sulfhydrylfreisetzung

Erhöhung des endogenen Nichtproteinsulfhydrylgehaltes (NPSH-Gehalt) in der Zelle.

7. Gewebshypoxie

Unmittelbare oder mittelbare (kreislaufbedingte) Erzeugung einer vorübergehenden geweblichen Hypoxie

8. Biochemischer Schock

Erzeugung eines reversiblen, biochemischen, zellulären Schocks mit reversibler Hemmung von endogener Atmung, Mitose und DNA-Synthese.

9. "Restitutionsschutz"

Restitution bereits radikalisierter, biologischer Verbindungen durch wechselseitigen Energie- und Ladungsaustausch.

Alle Aminothiole müssen vor der Strahlenexposition am Ort ihrer Wirkung sein (16). Bei späterer Applikation (bereits ca. 15 min. nach Bestrahlung) nimmt die Wirkung rasch ab. Sie schützen die DNA (im Konzentrationsbereich von 5 - 60 mol/l in vitro) bis zu einem gewissen Grade vor strahlungsbedingten Einzel- und Doppelstrangbrüchen und vermindern die strahleninduzierte Absterbequote der Zellen (5, 64, 67, 74, 81).

Die praktische Bedeutung von Strahlenschutzstoffen liegt sowohl auf dem Gebiet des nuclearen Katastrophenschutzes als auch im medizinischen Bereich. Die Anforderungen an die Anwendung sollten sein: Perorale Applikation mit möglichst hoher Strahlenschutzeffektivität, schneller Wirkungseintritt, lange Wirkungsdauer (2 - 4 h), große therapeutische Breite, keine negativen Nebeneffekte, auch bei wiederholter Applikation keine Toxizitätssteigerung und kein Effektivitätsverlust. Es ist verständlich, daß diese Anforderungen nicht nur von einem Strahlenschutzstoff erfüllt werden können. Daher wird die Zukunft bei Kombinationspräparaten liegen, deren einzelne Komponenten jeweils bestimmten Anforderungen genügen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Stoffe der SH-Gruppe waren

AET, Cystein und L-Glutathion (GSH). Ähnlich den übrigen Thiolen und Aminothiolen stellen sie die klassischen Strahlenschutzstoffe dar. Sie sind gute Reduktionsmittel und Wasserstoffdonatoren. Ihre zelluläre Wirkung ist insbesondere durch Stoffwechseldepression und Gewebshypoxie gekennzeichnet. Systemisch entfalten sie toxische Wirkungen auf Nervensystem, Herz und Kreislauf (23, 54, 59, 95, 96, 97). In Konzentrationen von 1 - 60 mmol/l (in vitro) bzw. 100 - 200 mg/kg (in vivo) hemmen Aminothiole 20 - 60 Stunden lang die DNA-Synthese. Die Mitoseaktivität wird ebenfalls gehemmt (7, 35, 39, 44, 62).

2.5 "Elektronenaffine Substanzen" (N-Äthylmaleimid und Metronidazol)

N-Äthylmaleimid ist ein starkes Zellgift und wird vor allem in der Krebsforschung verwendet. Es hemmt die DNA-Synthese und sensibilisiert hypoxische Zellen sowohl in vitro als auch in vivo gegenüber Bestrahlung (0,75 $\mu\text{mol/l}$ - 1 mmol/l) (1). N-Äthylmaleimid reagiert mit Sulfhydrylgruppen und Thymin (15). Die Substanz verbindet sich wahrscheinlich über die NH_2 -Gruppe mit der DNA (Interferenz mit SH-Bindung) und hemmt (in vitro; 0,75 $\mu\text{mol/l}$) so die DNA-Synthese und die Postirradiations-Reparatur (98). In "Rapid-Mix-Studien" wurde festgestellt, daß N-Äthylmaleimid durch seine Elektronenaffinität die DNA gegenüber Bestrahlung sensibilisiert (2).

Metronidazol ist als Trichomonazid und Amöbizid unter dem Namen Clont[®] oder Flagyl[®] im Handel. Es induziert Lungentumoren bei Mäusen und Punktmutationen in Bakterien (50). Metronidazol hemmt im reduzierten Zustand die DNA-Synthese (in vitro; $5 \times 10^5 \mu\text{mol/l}$) (45, 73).

Die Substanz ist nur im reduzierten Zustand wirksam. Sie verbindet sich infolge ihrer Elektronenaffinität mit der DNA, induziert Strangbrüche, führt zur Auflösung der Helixstruktur und damit zur Inaktivierung des Makromoleküls. Mit Hemmung der DNA-Reparatur wird gerechnet (30, 45). Clont[®] wirkt unter anoxischen Bedingungen sensibilisierend gegen ionisierende Strahlen (60 mmol/l) (73). Als wirksamer "Radiosensitizer" für hypoxische Säugetiertumorzellen spielen Metronidazol, ebenso wie Misonidazol und andere "Nitroheterocyclen", eine wesentliche Rolle in der experimentellen Medizin, der Strahlenbiologie und der Radiotherapie von Malignomen.

2.6 Cytosinarabinosid

Cytosinarabinosid beeinflusst den Nukleinsäurestoffwechsel im Sinne eines Antimetaboliten. Er wird daher bei der Behandlung von Leukose und Tumoren verwendet. Die LD₅₀ liegt bei Hunden und Affen bei 1 - 4 g/kg. Zu den systemischen Wirkungen toxischer Dosen gehören Knochenmarkdepression und Ulcera der Darmschleimhaut. In vivo kann Cytosinarabinosid auf Jejumm-Krypten-Zellen radioprotektiv (200 mg/kg; 12 Stunden vor Bestrahlung) wirken (79).

Die DNA-Synthese wird durch Cytosinarabinosid (0,3 bis 30 μ mol/l) 6 - 8 Stunden lang gehemmt, weshalb es sekundär auch zur Beeinflussung der RNA- und Proteinsynthese kommen kann (66). Wirksamer Metabolit ist das araC-Triphosphat.

Der Wirkungsmechanismus der Verbindung besteht in der Hemmung der Bildung neuer "Replicons" und (Nebeneffekt) der Polynucleotidkettenverlängerung. Einerseits werden etwa die DNA-Polymerase II in E.coli und die DNA-Polymerase α in L-Zellen von Mäusen gehemmt, andererseits wird Cytosinarabinosid in neusynthetisierte DNA eingebaut und scheint die

Kettenverlängerung in der wachsenden DNA anzuhalten (8, 29). Auch DNA-Reparaturmechanismen werden beeinflusst (in vitro; 10^{-5} mol/l) (29, 40, 107). Sie werden wahrscheinlich während des Polymerisationsschrittes gehemmt, da Cytosinarabinosid oft am Ende einer neusynthetisierten DNA zu finden ist (83). Über Hemmung der Kettenverlängerung akkumulieren daher DNA-Strangbrüche.

2.7 Ethidiumbromid

Ethidiumbromid gehört zu den Substanzen, welche intercalierend an die DNA gebunden werden. Die Substanz besitzt somit in der analytischen Biochemie (fluorimetrische DNA-Bestimmung), in der molekularen Biochemie (Untersuchungen an der DNA) und in der experimentellen Medizin eine wesentliche Bedeutung. In hohen Konzentrationen (in vitro z.B.: 100 $\mu\text{g/ml}$) hemmt es die semikonservative DNA-Synthese, den DNA-Repair, die DNA-Polymerasen α und β und DNasen (3).

In Konzentrationen über 10 $\mu\text{g/ml}$ hemmte Ethidiumbromid die DNA-Synthese von Ovarzellen des Chinesischen Hamsters in vitro, während sich bei geringeren Substanzkonzentrationen (10^{-1} - 10 $\mu\text{g/ml}$) eine Synthesestimulierung zeigte (57). Die molekular-biologische Erklärung für dieses scheinbar paradoxe Phänomen wird in dem Umstand gesehen, daß die Verbindung in kleinen Konzentrationen die Helixstruktur der DNA auflockert (entdreht), in höheren dagegen verfestigt (in Gegenrichtung verdreht). Im ersteren Fall erhöht, im letzteren vermindert sich die Verfügbarkeit der DNA-Matrix für die Syntheseleistung (33).

2.8 Bleomycin

Bleomycin wurde erstmals von UMEZAWA u.a. (69) aus Kulturen von *Streptomyces verticillus* isoliert. Es wurden bisher mehr als 200 Bleomycinarten gefunden und charakterisiert. Die chemische Struktur weist 5 Aminosäuren, L-Glucose, 3-O-Carbamoyl-D-Mannose und eine Aminorestgruppe auf. Durch letztere (Amine und Polyamine) unterscheiden sich die verschiedenen Bleomycinarten (38, 69). Bleomycin hat gute antibiotische Eigenschaften gegen eine Anzahl von Mikroorganismen und besitzt zytostatische Wirkungen sowohl in vivo als auch in vitro (10).

Bleomycin hemmt im Konzentrationsbereich über 10 µg/ml (in vitro und in vivo) die DNA-Synthese; Protein- und RNA-Synthese werden zunächst kaum beeinflusst (38, 69, 91, 99, 100). Der molekulare Wirkungsmechanismus von Bleomycin besteht primär in der Erzeugung von DNA-Strangbrüchen durch Entfernung von Thymin aus der Polynucleotidkette (Konzentrationsbereich $\leq$ 100 µg/ml). Bei höheren Konzentrationen (experiment. Nachweis bei 12 mg/ml) sind alle Nucleinsäurebasen betroffen. Auch DNA-Ligasen, DNA-Polymerasen, DNA-abhängige RNA-Polymerasen und die Desoxyribonucleasen I und II werden durch Bleomycin gehemmt (1 - 6 µg/ml).

Bleomycin findet sich in der Zelle hauptsächlich an der Zellkernmembran, nicht im Nucleoplasma. Die durch Bleomycin erzeugten Einzel- und Doppelstrangbrüche werden, mit wesentlichen Anteilen, sowohl in vitro als auch in vivo innerhalb 4 - 24 Stunden repariert (69, 91, 99, 100). Im Zusammenhang damit wird die DNA-Polymerase β aktiviert (wirksame Bleomycin-konzentration: 20 - 50 µg/0,5 ml). Dieses Enzym besorgt weitgehend spezifisch die reparaturgebundene Nucleotidpolymerisierung.

2.9 Coffein

Pharmakologisch wirkt Coffein anregend auf das zentrale Nervensystem sowie Herz- und Nierentätigkeit. Es hemmt die 3',5'-cAMP-Phosphodiesterase und bewirkt somit eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung. Außerdem greift Coffein in die Steuerungsvorgänge der intrazellulären Ca^{++} -Ionen ein (46, 52).

Die Befunde zur Wirkung von Coffein im Zusammenhang mit ionisierenden Strahlen sowie chemischen Carcinogenen und Mutagenen sind widersprüchlich, wie sich aus den nachstehend zitierten Versuchsmodellen ergibt:

- a) Coffein (in vitro, 2 mmol/l) erhöhte den bestrahlungsinduzierten Zelltod bei V79, nicht aber bei Hela-Zellen (80).
- b) Coffein zeigte in vivo eine Strahlenschutzwirkung bei Mäusen (53) (Überlebenssteigerung von Jejunumzellen; 120 mg/kg, i.p. 60 - 120 min. vor der Bestrahlung).
- c) Die nach einer Bestrahlung auftretende Depression der DNA-Synthese wurde durch Coffein verringert oder verkürzt. Dagegen verstärkte eine 4-stündige Nachbehandlung mit Coffein (1 - 2 mmol/l) den röntgenstrahleninduzierten Zelltod (36, 52).
- d) Coffein erhöhte die durch UV-Bestrahlung bedingte Zelltodrate (86). Die durch 4-Nitro-chinolin-1-oxid induzierte Tumorgenese bei Mäusen war durch Coffein zu hemmen (42). Über Cocarcinogenität von Coffein (27) in Hamsterzellen und Mutagenität (47) in Drosophila- und menschlichen Zellen (in vitro) wurde berichtet; Coffein gilt dagegen nicht als Carzinogen (63). Im Zusammenhang mit Untersuchungen zum molekularen Wirkungsmechanismus von Coffein im DNA-Stoffwechsel wurde zumindest bei Prokaryonten die Hemmung der Rekombinationsreparatur nachgewiesen (89). Analoge Effekte auf Eukaryontenzellen sind umstritten; eine Hemmung der Excisionsreparatur ist bisher nicht einwandfrei nachgewiesen (32).

2.10 Diäthylthiocarbamat

Diäthylthiocarbamat ist ein Sulfhydryl-Metall-Chelator mit Affinität zu Cu (II), Ni und Zn. Seine oxidierte Disulfidform, unter dem Handelsnamen Antabus[®] bekannt, wird in der Behandlung von chronischem Alkoholismus eingesetzt.

Diäthylthiocarbamat hemmt die DNA-Synthese und erhöht den zellulären Strahlenschaden (in vitro, 2,4 mmol/l) (88, 101). Der Einsatz dieser Verbindung in der experimentellen Medizin beruht u.a. auf ihrer Fähigkeit, die Superoxiddismutase zu hemmen (72, 78). Das Enzym ist in allen sauerstoffmetabolisierenden Zellen vorhanden und katalysiert die Reaktion:



Das - insbesondere durch Lipidperoxidation zellschädigend wirkende - Superoxidanion wird bei dieser Reaktion eliminiert (13).

Die vorliegenden Ausführungen mögen verdeutlicht haben, daß die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen in verschiedener Weise in den DNA-Stoffwechsel eingreifen können und somit unterschiedliche Wirkungstypen repräsentieren. Unter Berücksichtigung des semikonservativen und unprogrammierten Einbaus von TdR-³H in die DNA von Rattenthymozyten in vitro sollten nunmehr die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Zeigen die untersuchten Substanzen ein ihrem Wirkungsmechanismus entsprechendes typisches Wirkungsspektrum?
2. Lassen sich Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen nachweisen?
3. Sind die an intakten Thymozyten erhaltenen Ergebnisse auf UV-bestrahlte Zellen übertragbar?

Die unter den genannten Gesichtspunkten durchgeführten Untersuchungen erstreckten sich zunächst auf einige methodische Aspekte. Im weiteren wurden orientierende Aussagen über Art

und Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung erhalten. Teil 3 und 4 der Analysen schließlich galten dem statistischen Nachweis festgestellter Substanzwirkungen und der Frage ihrer Übertragbarkeit auf UV-bestrahlte Zellen.

3. Material und Methodik

3.1 Reagentien und Tiermaterial

3.1.1 Reagentien: -----

1. AET

S-(2-Aminoäthyl)-isothiuroniumbromid-hydrobromid,
SERVA Heidelberg, Nr. 12350

2. N-Äthylmaleimid (NEM)

1-Äthyl-1H-pyrrol-2,5-dion
SERVA Heidelberg, Nr. 11331

3. Bleomycin (BLM)

MACK Illertissen, Nr. 10216^{*)}

1 Ampulle enthält 7 - 11 mg Trockensubstanz = lyophilisiertes Bleomycinsulfat entsprechend einer standardisierten biologischen Aktivität von 1400 - 2100 µg/mg biologisch aktiver Reinsubstanz pro mg Präparat

4. Coffein (Co) (DAB 7)

1,3,7 - Trimethylxanthin

Hausapotheke der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

5. L-Cystein · HCl · H₂O (Cy)

2-Amino-3-mercaptopropionsäure
SERVA Heidelberg, Nr. 17760

6. Cytosin-arabinosid-Base (araC)

1-β-D-Arabinofuranosylcytosin
MACK Illertissen, Nr. 04144^{*)}

7. Diäthyläther

MERCK, Nr. 926

8. Diäthylthiocarbamat · Na-salz · 3 H₂O (DDC)

SERVA Heidelberg, Nr. 18811

*) Für die freundliche Überlassung der Substanzen bin ich den Herstellerfirmen zu besonderem Dank verpflichtet.

9. Desoxyribonucleinsäure (DNA)
hochmolekular, Na-Salz aus Kälberthymus, mindestens
95 % DNA, Molekulargewicht 8 900 000, N ca. 14,5 %,
P ca. 8%
EGA-Chemie Steinheim, Nr. 16.820-3
10. Ethidiumbromid (EB)
2,7-Diamino-10-äthyl-9-phenyl-phenanthrinum-bromid
SERVA Heidelberg, Nr. 21238
11. D (+)-Glucose (Monohydrat)
MERCK, Nr. 8342
12. L-Glutathion reduziert, krist.reinst. (GSH)
γ-L-Glutamyl-l-cysteinylglycin
SERVA Heidelberg, Nr. 23150
13. HANKS-Lösung
(ohne Ca^{++} , Mg^{++} ; pH=7,4)
Einer Lösung von 136,9 mmol Natriumchlorid, 0,33 mmol
di - Natriumhydrogenphosphat - 2 - hydrat, 5,36 mmol Kalium-
chlorid, 0,36 mmol Kaliumhydrogenphosphat und 5,55 mmol
Glucose in einem Liter bidestilliertem Wasser wurden
25 ml einer isotonischen, wässrigen Lösung von 167 mmol
Natriumbikarbonat pro einem Liter zugesetzt.
14. Hydroxyharnstoff (HU)
Carbamoylhydroxylamin
SERVA Heidelberg, Nr. 25435
15. Kaliumchlorid
MERCK, Nr. 4936
16. Kaliumhydrogenphosphat
MERCK, Nr. 4873
17. Metronidazol (Clont[®])*)
2-Methyl-5-nitro-imidazol-1-äthanol
BAYER Leverkusen, Pt. 348 756

*) Für die freundliche Überlassung der Substanzen bin ich
den Herstellerfirmen zu besonderem Dank verpflichtet.

18. ^3H -Methylthymidin (TdR - ^3H)
40 - 60 Ci/mmol
Radiochemical Center Amersham, TRK 418
19. Natriumchlorid
MERCK, Nr. 6409
20. di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat
MERCK, Nr. 6580
21. Perchlorsäure 70 %
MERCK, Nr. 519
22. Quickszint[®] 402
Fluoreszenz-Maximum bei 415 nm
KOCH-LIGHT-Laboratories
Ltd. Nr. 16632

3.1.2 Tiermaterial -----

Die Versuche wurden mit ca. 300 weiblichen Wistar-Ratten aus institutseigener, konventioneller Zucht (Körpergewicht ca. 250 g) durchgeführt.

Die Ratten wurden in Makrolonkäfigen nach FISCHER und GÖNNERT (15x21x37 cm) bei Zimmertemperatur und Gruppenstärken von max. 5 Tieren pro Käfig gehalten. Altromin[®] - Preßfutter (ALTROGGE Kraftfutter GmbH, Lage, Lippe) und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

3.2 Versuchsablauf

Pro Versuch wurden drei Tiere benötigt.

3.2.1 Gewinnung der Thymus-Zellen

Zur Gewinnung der Thymuszellen diente eine andernorts publizierte laborübliche Methode, mit der eine biologisch aktive (Farbstoffausschluß, RNA- und Proteinsynthese) Zellsuspension gewonnen wird (103).

Die Tiere wurden zunächst mit Diäthyläther oberflächlich narkotisiert, anschließend dekapitiert und entblutet. Unmittelbar darauf wurde der Thymus entnommen und in HANKS-Lösung gewaschen. Das Organ wurde von fremden Gewebsresten gesäubert und mit der Schere soweit wie möglich zerkleinert. Die Gewebssmasse wurde anschließend 30 min aerob bei 37°C in 10 ml HANKS-Lösung (Ca^{++} - und Mg^{++} -frei) inkubiert (SDS-Versuch - semikonservative DNA-Synthese). Im UDS-Versuch (unprogrammierte DNA-Synthese) enthielt die Zellsuspension zur Hemmung der semikonservativen DNA-Synthese 10^{-2} mol/l Hydroxyharnstoff (HU) in Ca^{++} und Mg^{++} -freier HANKS-Lösung.

Der weitere Gewebeaufschluß erfolgte in einem 30 ml-Potter-Gefäß durch einmaliges vorsichtiges Auf- und Abbewegen des passenden, aber locker eingeschliffenen Teflon-Stempels (Vermeiden von Unter- oder Überdruck, keine Drehbewegungen des Stempels).

Die erhaltene Zellsuspension (ca. $2 \cdot 10^8$ Zellen/ml: 103) wurde nun 2 min bei $2250 \text{ U} \times \text{min}^{-1}$ (Laborzentrifuge Junior 2 der Fa. CHRIST) in der Kälte (+ 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das zelluläre Sediment erneut in HU-freier (SDS) bzw. in 10^{-2} mol/l HU enthaltender HANKS-Lösung (UDS) aufgenommen und durch Strumpf-Nylon filtriert.

3.2.2 Beeinflussung der Thymozyten durch Reagentien und UV-Licht

Die verschiedenen Reagentien wurden in HANKS-Lösung in den für den jeweiligen Versuch erforderlichen Konzentrationen gelöst. Jede Versuchsreihe bestand aus 24 Einzelproben. Da jede Konzentrationsstufe einer Versuchsreihe mindestens 3-fach belegt werden sollte, konnten neben den jeweiligen Kontrollwerten gleichzeitig bis zu 7 Konzentrationen untersucht werden.

Die durch Strumpf-Nylon filtrierte Zellsuspension wurde daher auf 24 Einzelproben zu jeweils 1 ml aufgeteilt. Von diesen Proben wurden jeweils 21 (7 Dreifachansätze) mit einer Lösung der gewünschten Konzentration bzw. 3 (1 Dreifachansatz) mit dem Volumen des Lösungsmittels (50 μ l) versetzt und aerob unter leichtem Schütteln inkubiert (Vorinkubation).

Bei Versuchen mit UV-Bestrahlung wurden die Suspensionen vorher in eisgekühlten Petrischalen in dünner Schicht (ca. 0,04 ml/cm²) ausgebreitet und mit der UV-Lampe (PHILIPS TUV 30 W, Maximalemission 254 nm, Fluenz 4 J x m⁻² xs⁻¹) bestrahlt.

Anschließend wurden die Zellen in der Kälte erneut 2 min bei 2250 U x min⁻¹ zentrifugiert und der dabei erhaltene Überstand abgesaugt.

3.2.3 Einbau von ³H-Methyl-Thymidin

Das je Probe gewonnene zelluläre Sediment wurde erneut in 1 ml HU-freier (SDS) bzw. 10⁻² mol/l HU enthaltender HANKS-Lösung (UDS) aufgenommen, mit 50 μ l ³H-Methylthymidin (1,25 μ Ci pro 1,0 ml Zellsuspension, SDS, bzw. 5,0 μ Ci pro 1,0 ml Zellsuspension, UDS) versetzt und darauf 45 min bei 37°C aerob unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Inkubation durch Zusatz von 2 ml kal-

ter Perchlorsäure (1,5 mol/l) beendet. Vor der Weiterverarbeitung wurden die Proben 15 min im Eisfach (-15°C) abgekühlt.

3.2.4 Weitere Verarbeitung der Zellen zur Bestimmung der in ----- die DNA eingebauten ^3H -Aktivität -----

Nach der o.a. 15 min dauernden Kühl Lagerung wurden die Zellsuspensionen bei $+2^{\circ}\text{C}$ und $5000 \text{ U} \times \text{min}^{-1}$ (Laborzentrifuge Universal KS III der Firma CHRIST) 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Sediment zweimal in 5 ml Perchlorsäure (0,998 mol/l) gewaschen. Zur nun notwendigen Solubilisierung des DNA-Sediments wurde dieses in 2 ml Perchlorsäure (0,998 mol/l) resuspendiert, 20 min im kochenden Wasserbad erhitzt und anschließend 30 min im Eisfach (-15°C) abgekühlt. In dem nach neuerlicher Zentrifugation (10 min bei $4500 \text{ U} \times \text{min}^{-1}$) erhaltenen Überstand wurden die ^3H -Aktivität und die säurelöslich gewordenen DNA-Bestandteile gemessen.

3.2.5 Messung der ^3H -Aktivität -----

Die Messung der Impulsrate erfolgte in einem Flüssigkeitszintillationsspektrometer (LS 230 Liquid Scintillation System BECKMAN[®]). 0,5 ml des Überstandes jeder Einzelprobe wurden mit 3 ml Quickszint[®] 402 in einer Polypropylen-Zählhülse (BECKMAN BIO VIAL[®], Nr. 566353) vermengt und in der Regel 2 min lang gemessen.

Der Quench-Effekt wurde über die Kanalverhältnismethode mit externem Standard korrigiert.

3.2.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Proben wurden im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und auf ihre Extinktion bei 260 und 280 nm hin im Spektralphotometer (PMQ II, Fa. ZEISS, Stuttgart) gegen eine DNA-freie Perchlorsäurelösung als Referenzlösung gemessen (90).

Nucleinsäuren haben im UV-Bereich ein Extinktionsmaximum bei 260 nm. Durch Subtraktion der bei 280 nm gemessenen Extinktion vom Extinktionswert bei 260 nm lassen sich unspezifische Absorptionen weitgehend eliminieren.

Die DNA-Konzentration konnte aus einer Eichkurve, die unter gleichen Bedingungen mit einer DNA-Lösung erstellt worden war, abgelesen werden. Die Extinktionsdifferenz ΔE 0,285 entsprach einer Konzentration von 0,1 mg DNA/ml der verdünnten Probe.

4. Ergebnisse

4.1 Versuche zur Methodik

4.1.1 Semikonservative DNA-Synthese

Der semikonservative TdR - ^3H -Einbau in die DNA stieg linear mit der TdR - ^3H -Konzentration an (Abb. 3). Die zeitabhängige Markierung der DNA zeigt Abb. 4. Der TdR - ^3H -Einbau erhöhte sich hier etwa 45 min lang annähernd linear, flachte dann ab (45 - 90 min) und ließ nach 90 min einen erneuten Anstieg erkennen.

4.1.2 Unprogrammierte DNA-Synthese

Durch Hydroxyharnstoff in der Konzentration von 10^{-2} mol/l wurde der semikonservative TdR - ^3H -Einbau um ca. 90% gehemmt (103). Zum Nachweis des durch UV-Licht stimulierten Einbaus hatte sich diese Hemmstoffkonzentration als optimal erwiesen (Abb. 5). Wurde die unprogrammierte DNA-Synthese in Abhängigkeit der UV-Dosis untersucht, ergab sich ein Maximum bei $72 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$. Jenseits dieser Dosis fiel die TdR - ^3H -Einbaurate dosisabhängig ab (Abb. 6).

4.1.3 Verhalten der semikonservativen und unprogrammierten DNA-Synthese in Abhängigkeit vom pH-Wert

Da einige Verbindungen den pH-Wert des Mediums geringgradig veränderten, wurde sein Einfluß auf die semikonservative und unprogrammierte DNA-Synthese untersucht.

Wie aus Abb. 7 ersichtlich, schwankte der TdR - ^3H -Einbau um maximal ca. $\pm 10\%$. Die beiden Extremwerte (pH 8,6 und 6,2) zeigten einen Anstieg der UDS um ca. $+15\%$.



Abb. 3: Semikonservativer TdR - ^3H - Einbau in die DNA von Thymuszellen der Ratte in Abhängigkeit von der ^3H -Methyl-tymidin-Konzentration

Z = Zerfälle

n = 3

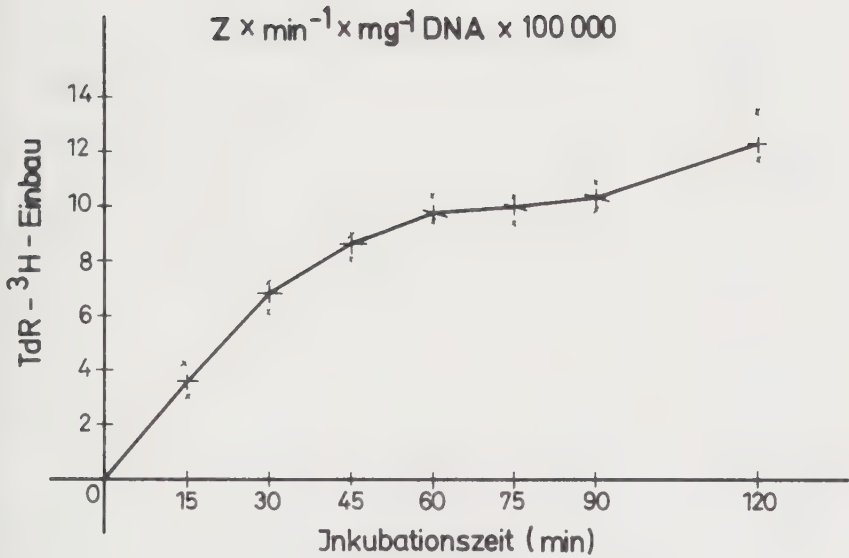


Abb. 4: Semikonservativer TdR - ³H - Einbau in die DNA von Thymuszellen der Ratte (1,25 $\mu\text{Ci}/1\text{ ml}$) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit
Z = Zerfälle
n = 3

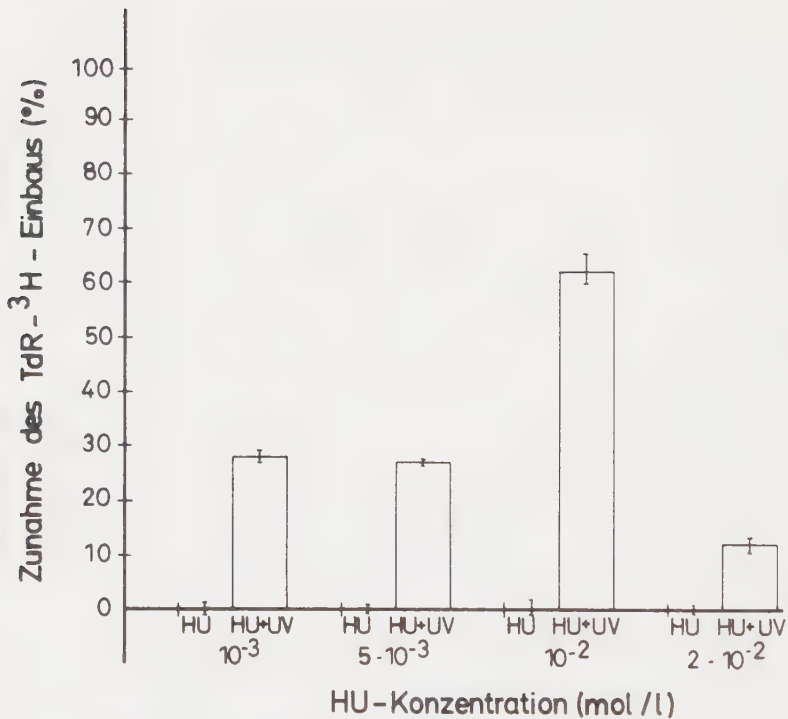


Abb. 5: Zunahme des In vitro-Einbaus von TdR-³H (5,0 μ Ci/ml) in die DNA von Thymuszellen der Ratte in Gegenwart von verschiedenen HU-Konzentrationen unmittelbar nach UV-Bestrahlung ($72 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$). Jeder Wert wurde dreifach an der gleichen Zellpräparation belegt.

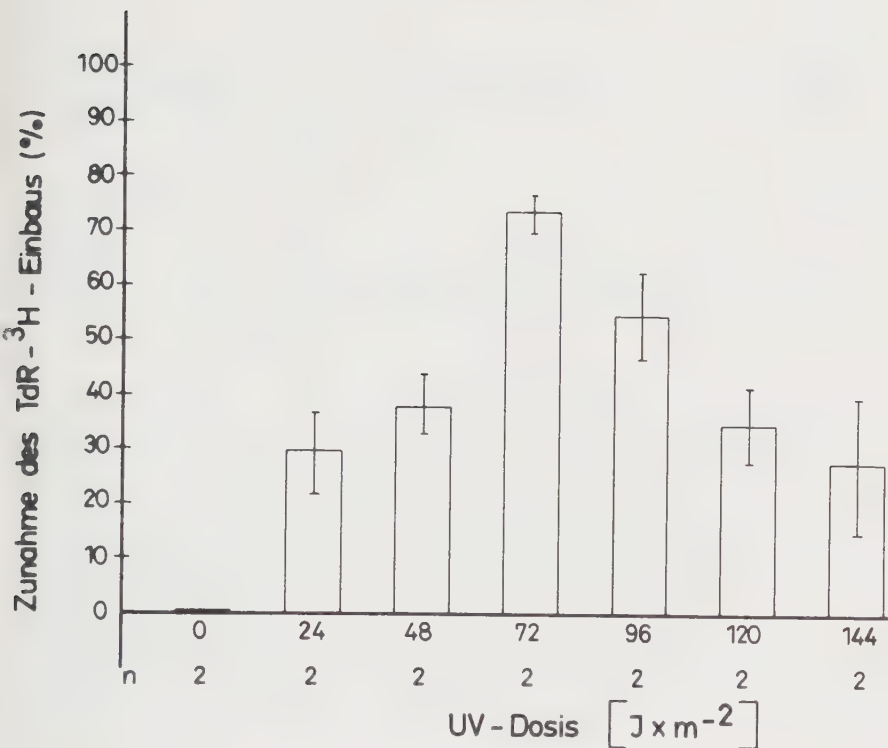


Abb. 6 : Zunahme des In vitro-Einbaus von TdR - ^3H in die DNA von Thymuszellen der Ratte in Gegenwart von 10^{-2} mol/l HU unmittelbar nach UV-Bestrahlung dosisabhängig.

n: Anzahl der Versuche (Dreifachbestimmung je Versuch)

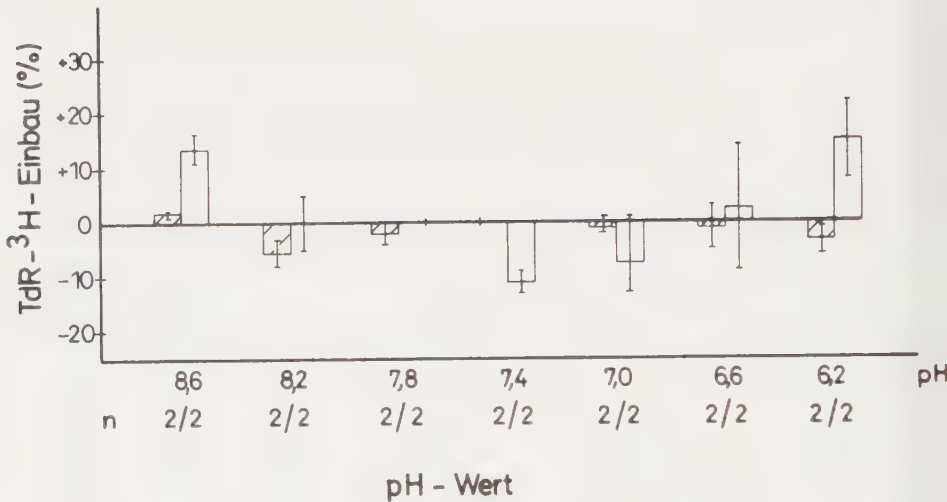


Abb. 7: Verhalten des TdR- ^3H (SDS: 1,25 $\mu\text{Ci}/1\text{ ml}$; UDS: 5,0 $\mu\text{Ci}/1\text{ ml}$) - In vitro-Einbaus in die DNA von Thymuszellen der Ratte in Abhängigkeit vom pH-Wert. Schraffierte Säulen: SDS (pH 7,4 = 0 %); weiße Säulen: UDS (pH 7,8 = 0 %) n: Anzahl der Versuche (Dreifachbestimmung je Versuch)

4.2 Wirkung und wirksame Konzentrationen einzelner Substanzen auf die semikonservative und unprogrammierte DNA-Synthese im Vorversuch

Die SDS wurde ab 7,11 mmol/l von AET konzentrationsabhängig verringert. Die UDS hatte ein Maximum zwischen 3,558 mmol/l und 7,11 mmol/l (Abb. 8). Der TdR- ^3H -Einbau fiel dann wieder ab.

Abhängig von der Konzentration wurde die SDS bei der Zugabe von Cystein verringert. Die UDS stieg bis zu einer Konzentration von 4,56 mmol/l an, fiel dann aber jenseits davon sehr rasch (Abb. 9).

L-Glutathion hemmte ab einer Konzentration von 4,88 mmol/l die SDS. Die UDS stieg bis zu einem ausgeprägten Maximum (ca. 65 %) an und fiel dann sehr langsam wieder ab (Abb. 10).

N-Äthylmaleimid reduzierte die SDS und UDS gleichermaßen. In Konzentrationen um 0,022 mmol/l deutete sich eine Aktivierung der UDS an (Abb. 11).

Metronidazol bewies keine eindeutige Wirkung auf SDS und UDS (Abb. 12).

Die SDS wurde durch Cytosinarabinosid im ganzen Konzentrationsbereich sehr stark reduziert, die UDS dagegen erst ab 2,04 mmol/l (Abb. 13).

Ethidiumbromid hemmte SDS und UDS konzentrationsabhängig, wobei die Wirkung auf die UDS etwas geringer zu sein schien (Abb. 14).

Keine erkennbare Reaktion bewirkte Bleomycin bezüglich der SDS. Die UDS erfuhr ab 100 µg/ml Zellsuspension einen eindeutigen Anstieg (Abb. 15).

Coffein hatte keine Wirkung auf die SDS. Die UDS stieg zwar um ca. 20 % an (0,00051 mmol/l), zeigte aber in höheren Konzentrationen starke Schwankungen (Abb. 16).

Diäthylthiocarbamat ergab eine konzentrationsabhängige Hemmung der SDS. Die UDS wurde bei einer Konzentration von 8,877 mmol/l um ca. 20 % reduziert (Abb. 17).

Abb. 8: Veränderungen des In vitro - Einbaus von TdR - ^3H in die DNA von Thymuszellen der Ratte nach 30 min Vorinkubation mit AET konzentrationsabhängig. Jeweiliger Kontrollwert gleich 0 % gesetzt. Schraffierte Säulen: SDS; weiße Säulen: UDS.
n: Anzahl der Dreifachbestimmungen; die in die Säulendiagramme eingezeichneten Längsbalken verbinden die Extremwerte der Versuche und stellen somit nicht die Standardabweichung dar. Dies gilt für alle in Abschnitt 2 der Arbeit dargestellte Ergebnisse.

Konzentrationen von AET in mmol/l:

0,444 (0,125 mg/ml); 0,889 (0,25 mg/ml); 1,779 (0,5 mg/ml); 3,558 (1 mg/ml); 7,11 (2 mg/ml); 14,232 (4 mg/ml); 28,465 (8 mg/ml)

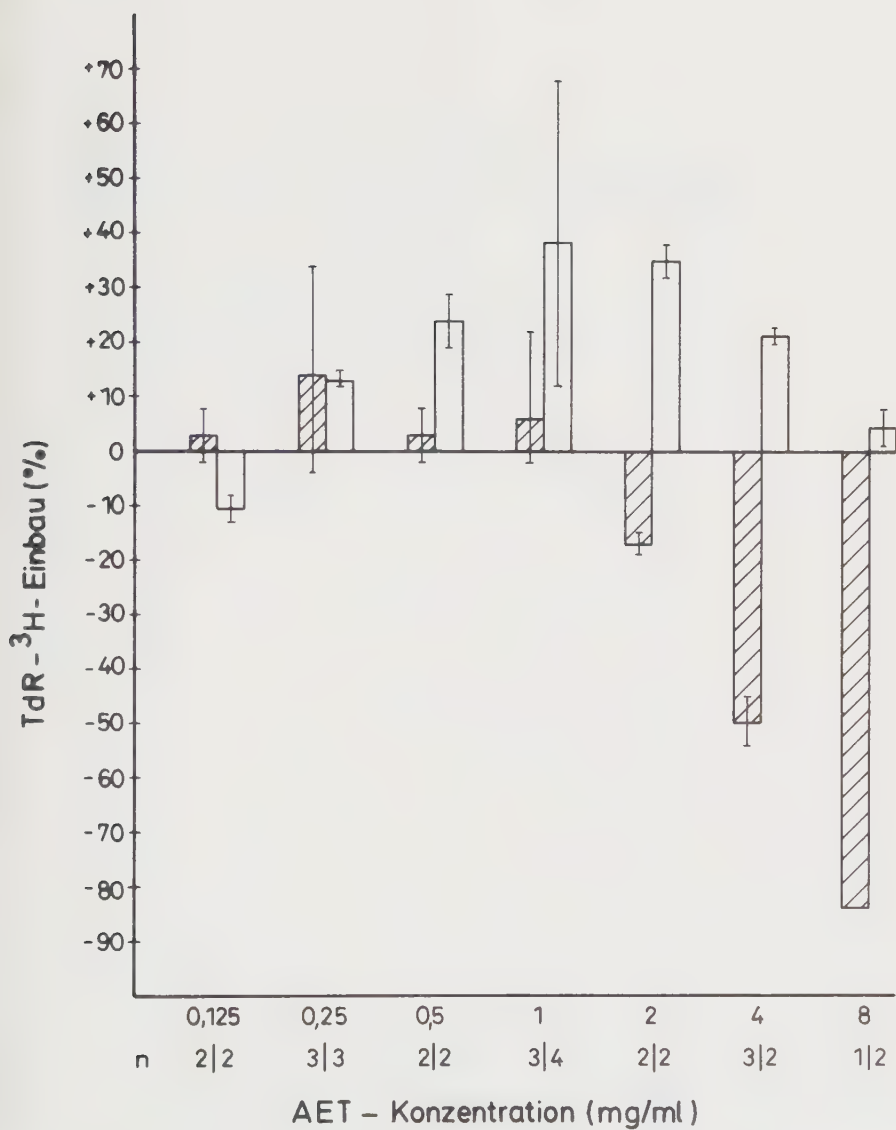


Abb. 9: Veränderungen des In vitro - Einbaus von TdR - ^3H in die DNA von Thymuszellen der Ratte nach 30 min Vorinkubation mit Cystein konzentrationsabhängig. Weitere Kennzeichnung siehe Abb. 8.

Konzentrationen von Cystein in mmol/l:

1,139 (0,2 mg/ml); 2,278 (0,4 mg/ml); 4,556 (0,8 mg/ml); 6,834 (1,2 mg/ml); 9,112 (1,6 mg/ml); 11,39 (2,0 mg/ml); 14,237 (2,5 mg/ml)

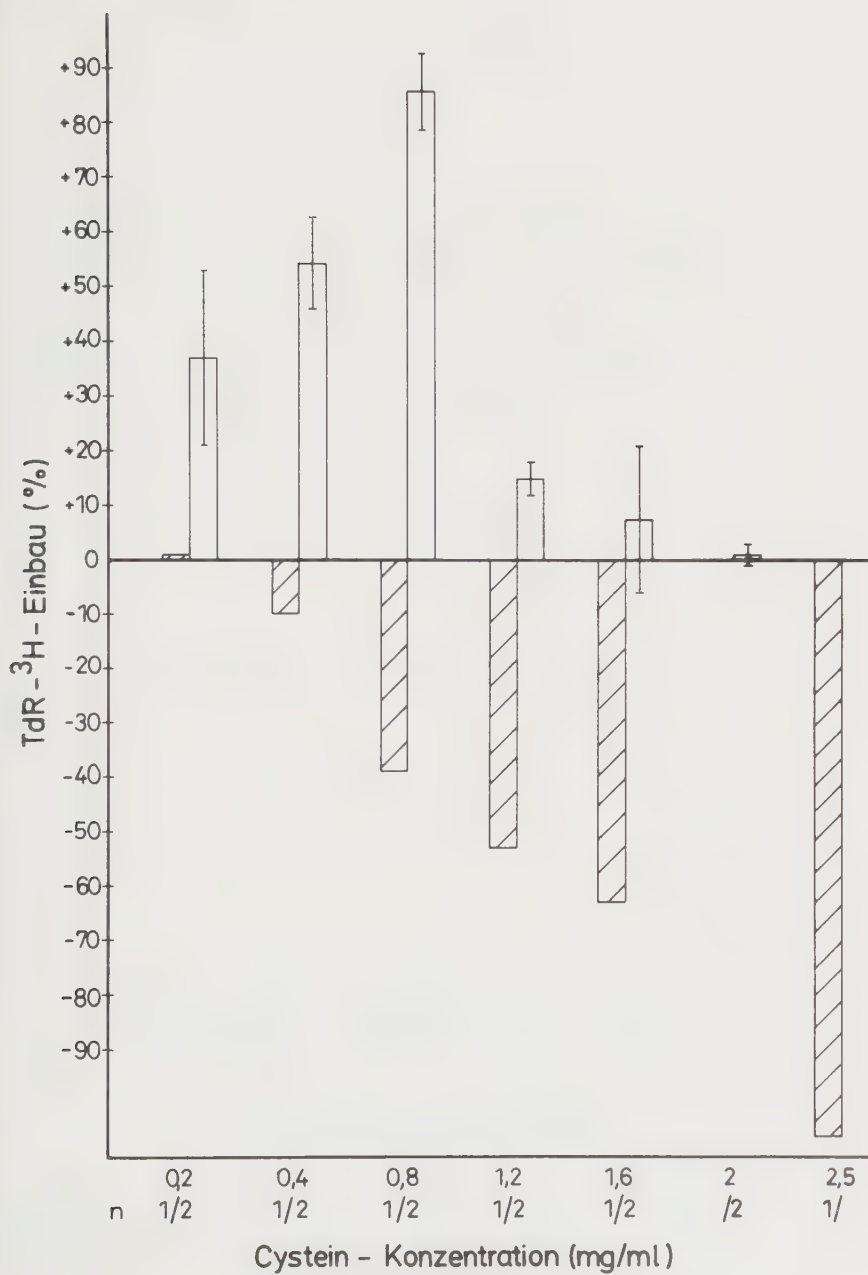
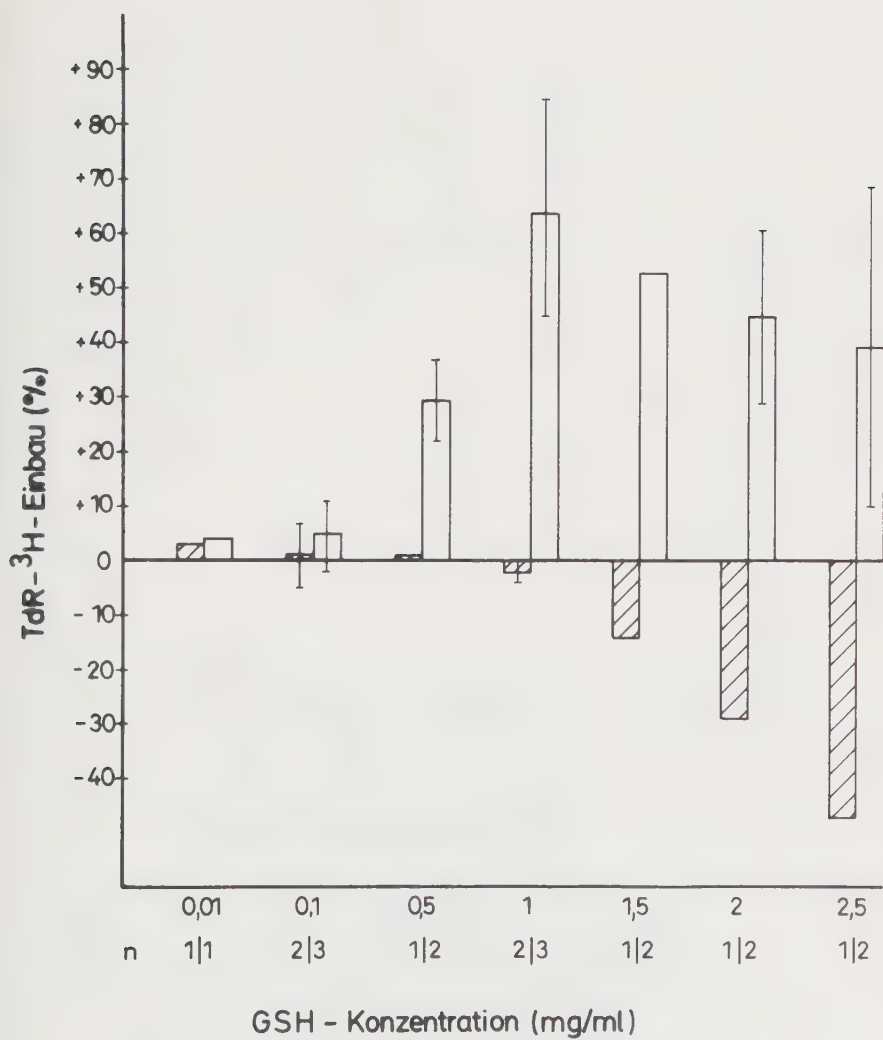


Abb. 10: Veränderungen des In vitro -Einbaus von TdR - ^3H in die DNA von Thymuszellen der Ratte nach 30 min Vorinkubation mit Glutathion konzentrationsabhängig. Wo bei mehreren Versuchen keine Extremwerte angegeben werden, waren die Abweichungen zu gering, um im gewählten Maßstab noch dargestellt werden zu können. Weitere Kennzeichnung siehe Abb. 8.

Konzentrationen von GSH in mmol/l:

0,033 (0,01 mg/ml); 0,325 (0,1 mg/ml); 1,627 (0,5 mg/ml); 3,254 (1,0 mg/ml); 4,882 (1,5 mg/ml); 6,507 (2,0 mg/ml); 8,135 (2,5 mg/ml)



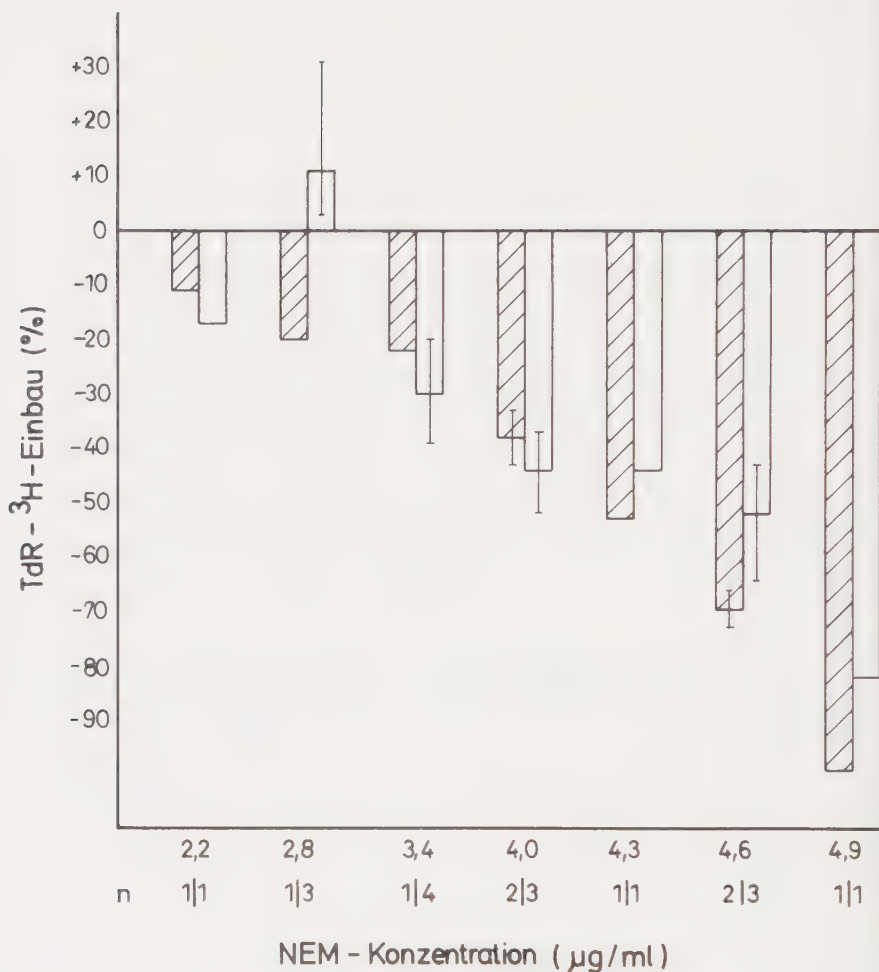


Abb. 11: Veränderungen des In vitro - Einbaus von TdR - ^3H in die DNA von Thymuszellen der Ratte nach 30 min Vorinkubation mit N-Äthylmaleimid konzentrationsabhängig. Weitere Kennzeichnung siehe Abb. 8.

Konzentrationen von NEM in mmol/l:

0,018 (2,2 µg/ml); 0,022 (2,8 µg/ml); 0,027 (3,4 µg/ml); 0,032 (4,0 µg/ml); 0,034 (4,3 µg/ml); 0,037 (4,6 µg/ml); 0,039 (4,9 µg/ml)

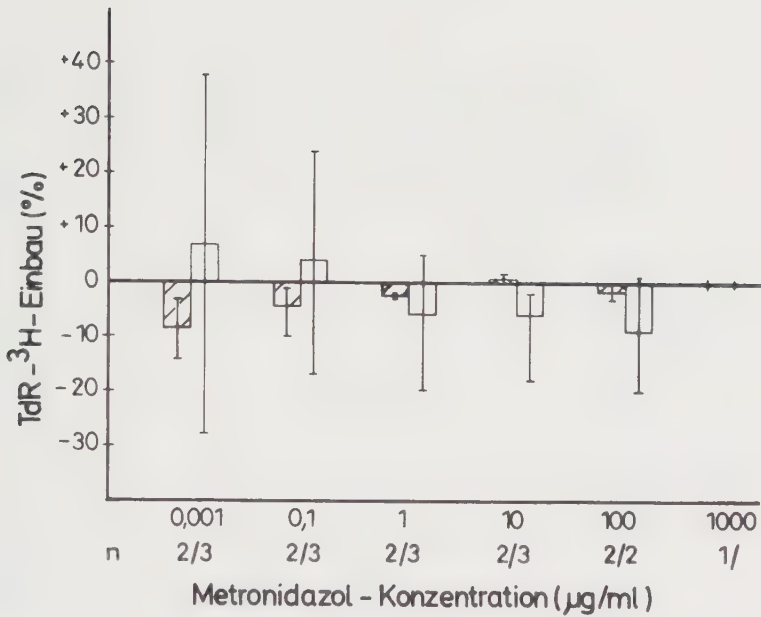


Abb. 12: Veränderungen des In vitro - Einbaus von TdR - ^3H in die DNA von Thymuszellen der Ratte nach 30 min Vorinkubation mit Metronidazol konzentrationsabhängig. Weitere Kennzeichnung siehe Abb. 8.

Konzentrationen von Metronidazol in mmol/l:
0,000006 (0,001 $\mu\text{g/ml}$); 0,0006 (0,1 $\mu\text{g/ml}$);
0,006 (1,0 $\mu\text{g/ml}$); 0,06 (10 $\mu\text{g/ml}$); 0,577 (100 $\mu\text{g/ml}$); 5,777 (1000 $\mu\text{g/ml}$)

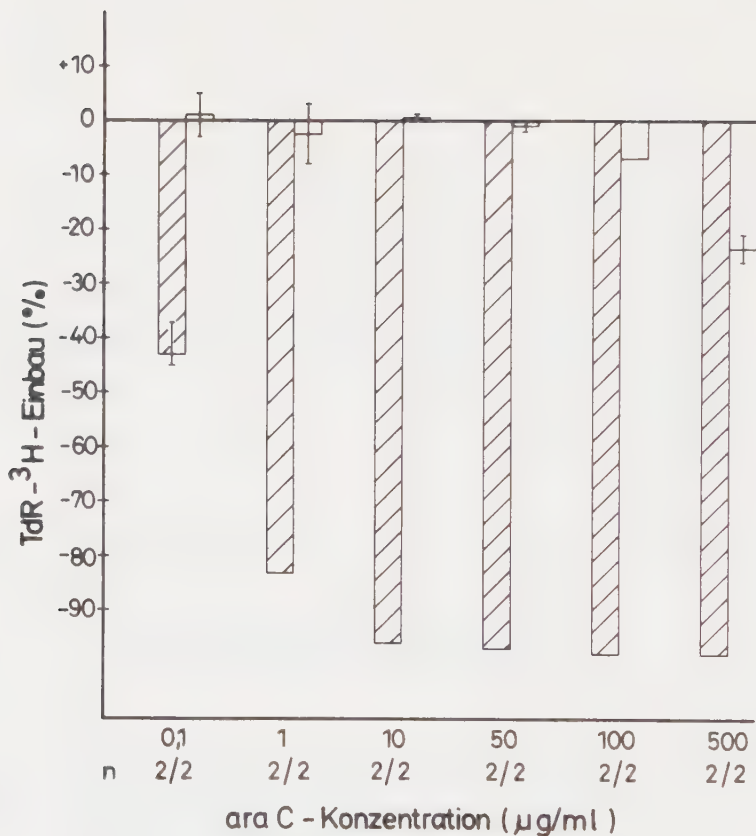


Abb. 13: Veränderungen des In vitro - Einbaus von TdR - ^3H in die DNA von Thymuszellen der Ratte nach 30 min Vorinkubation mit Cytosinarabinosid konzentrationsabhängig. Weitere Kennzeichnung siehe Abb. 8.

Konzentrationen von araC in mmol/l:

0,0004 (0,1 µg/ml); 0,004 (1 µg/ml); 0,04 (1,0 µg/ml); 0,204 (50 µg/ml); 0,408 (100 µg/ml); 2,04 (500 µg/ml)

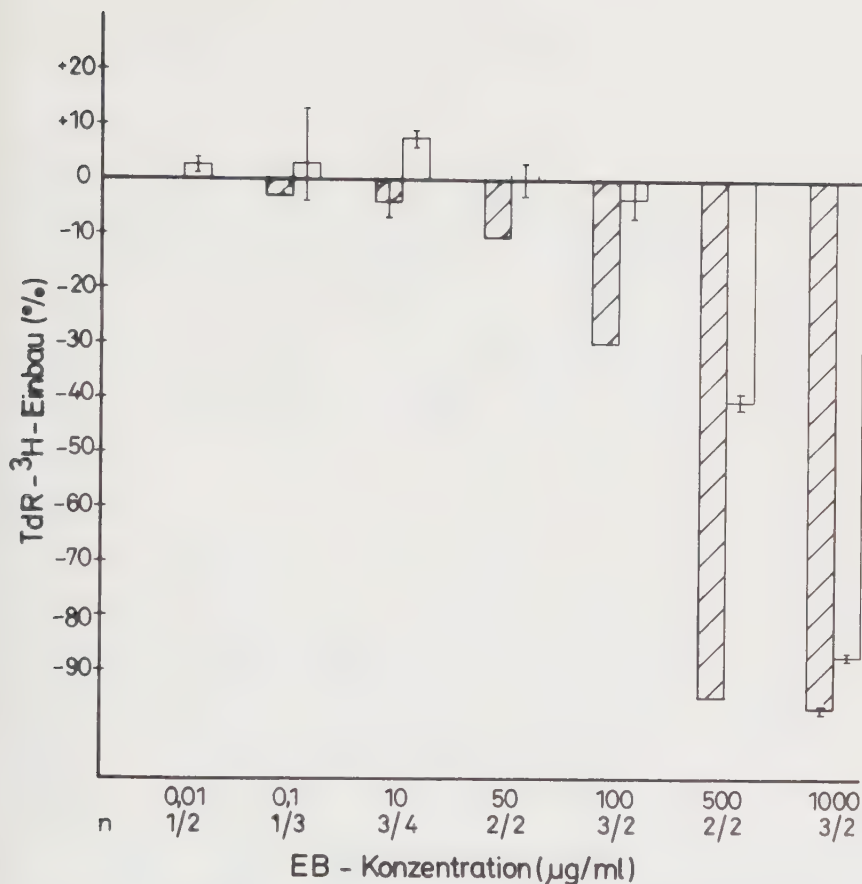


Abb. 14: Veränderungen des In vitro - Einbaus von TdR - ^3H in die DNA von Thymuszellen der Ratte nach 30 min Vorinkubation mit Ethidiumbromid konzentrationsabhängig. Weitere Kennzeichnung siehe Abb. 8.

Konzentrationen von EB in mmol/l:

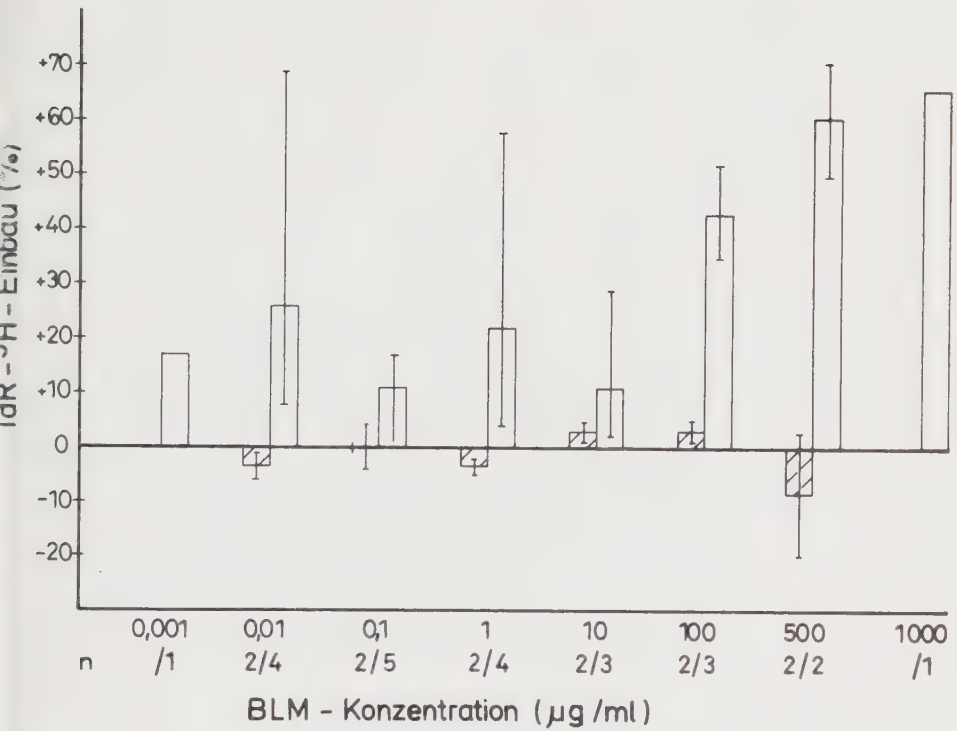
0,000025 (0,01 µg/ml); 0,00025 (0,1 µg/ml);

0,025 (10 µg/ml); 0,127 (50 µg/ml); 0,254 (100 µg/ml); 1,268 (500 µg/ml); 2,536 (1000 µg/ml)

Abb. 15: Veränderungen des In vitro - Einbaus von TdR - ^3H in die DNA von Thymuszellen der Ratte nach 30 min Vorinkubation mit Bleomycin konzentrationsabhängig. Weitere Kennzeichnung siehe Abb. 8.

Konzentrationen von BLM:

1000 $\mu\text{g/ml}$; 500 $\mu\text{g/ml}$; 100 $\mu\text{g/ml}$; 10 $\mu\text{g/ml}$; 1 $\mu\text{g/ml}$; 0,1 $\mu\text{g/ml}$; 0,01 $\mu\text{g/ml}$; 0,001 $\mu\text{g/ml}$



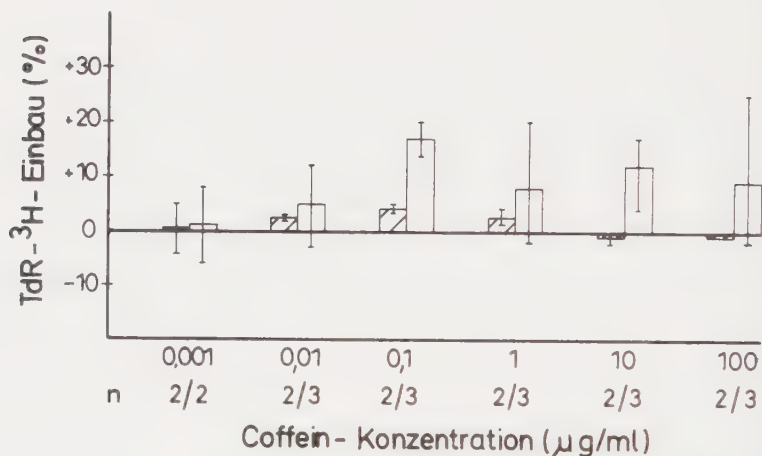


Abb. 16: Veränderungen des In vitro -Einbaus von TdR - ^3H in die DNA von Thymuszellen der Ratte nach 30 min Vorinkubation mit Coffein konzentrationsabhängig. Weitere Kennzeichnung siehe Abb. 8.

Konzentrationen von Coffein in mmol/l:

0,0000051 (0,001 µg/ml); 0,000051 (0,01 µg/ml);
 0,00051 (0,1 µg/ml); 0,0051 (1 µg/ml); 0,051
 (10 µg/ml); 0,51 (100 µg/ml)

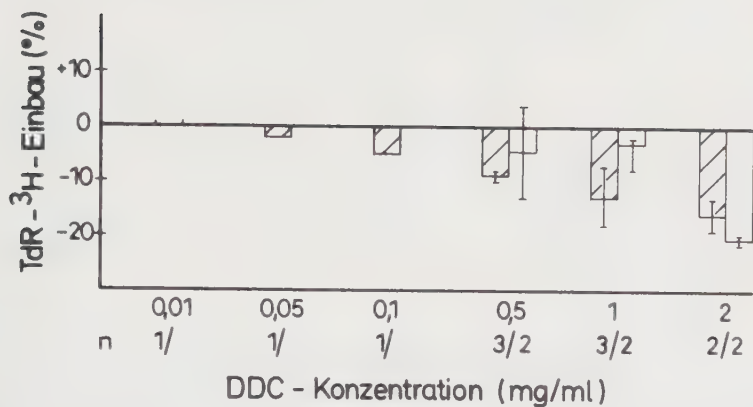


Abb. 17: Veränderungen des In vitro - Einbaus von TdR - ³H in die DNA von Thymuszellen der Ratte nach 30 min Vorinkubation mit Diäthylthiocarbamat konzentrationsabhängig. Kennzeichnung siehe Abb. 8.

Konzentrationen von DDC in mmol/l:

0,044 (0,01 mg/ml); 0,222 (0,05 mg/ml); 0,444 (0,1 mg/ml); 2,219 (0,5 mg/ml); 4,439 (1,0 mg/ml); 8,877 (2,0 mg/ml)

4.3 Statistischer Nachweis der Wirkung einiger Substanzen auf die unprogrammierte DNA-Synthese

Um Anhaltspunkte für den zum statistischen Nachweis der in den Vorversuchen festgestellten Substanzwirkungen erforderlichen Stichprobenumfang zu erhalten, wurden einige Verbindungen in einer größeren Versuchsreihe exemplarisch getestet. Die Konzentrationen wurden für N-Äthylmaleimid und Ethidiumbromid unter dem Gesichtspunkt gewählt Hinweise auf die niedrigste noch wirksame Konzentration zu erhalten.

Untersucht wurden hier AET (1,78 mmol/l), Cystein (4,56 mmol/l), L-Glutathion (3,25 mmol/l), N-Äthylmaleimid (0,02 mmol/l), Cytosinarabinosid (2,04 mmol/l) und Ethidiumbromid (0,25 mmol/l) in jeweils einem Versuch mit 12 Substanzenansätzen und 12 Ansätzen als Kontrollwerte. Die Auswertung erfolgte im t-Test nach STUDENT, die Standardabweichungen sind in der Abbildung angegeben.

AET bewirkte eine Erhöhung der UDS um 19 %, Cystein um 112 % und L-Glutathion um 162 %. N-Äthylmaleimid zeigte keine signifikante Wirkung. Cytosinarabinosid und Ethidiumbromid hemmten die UDS um 26 % bzw. 11 % (Abb. 18).

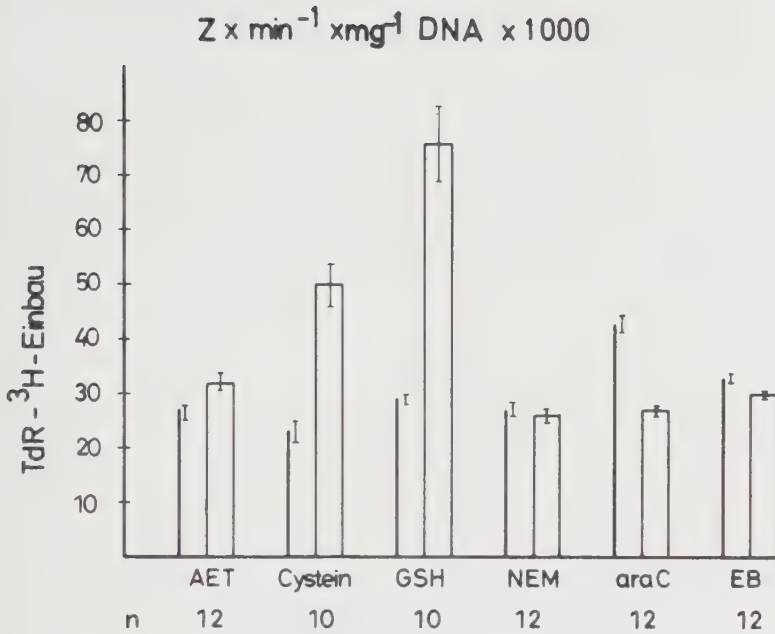


Abb. 18: TdR - ^3H (5 $\mu\text{Ci/ml}$)-In vitro -Einbau in die DNA von Thymuszellen der Ratte in Gegenwart von 10^{-2} mol/l HU (Kontrollwerte: schmale schwarze Säulen) nach 30 min Vorinkubation mit AET (1,78 mmol/l) $p: < 0,001$; Cystein (4,56 mmol/l) $p: < 0,001$; GSH (3,25 mmol/l) $p: < 0,001$; NEM (0,02 mmol/l) $p: > 0,05$; araC (2,04 mmol/l) $p: < 0,001$ und EB (0,25 mmol/l) $p: < 0,001$

Z = Zerfälle

n = Anzahl der Einzelwerte

4.4 Wirkung von AET auf die UV-stimulierte unprogrammierte DNA-Synthese

Abb. 19 zeigt die Zunahme des unprogrammierten TdR - ^3H - Einbaus unter Einwirkung verschiedener AET-Konzentrationen nach unmittelbar darauffolgender UV-Bestrahlung mit $72 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$. Es ergab sich ein langsamer, konzentrationsabhängiger Anstieg bis zu einem Maximum (ca. 80 %) bei $7,12 \text{ mmol/l}$. Jen-
seits davon fiel der TdR - ^3H - Einbau rasch ab.

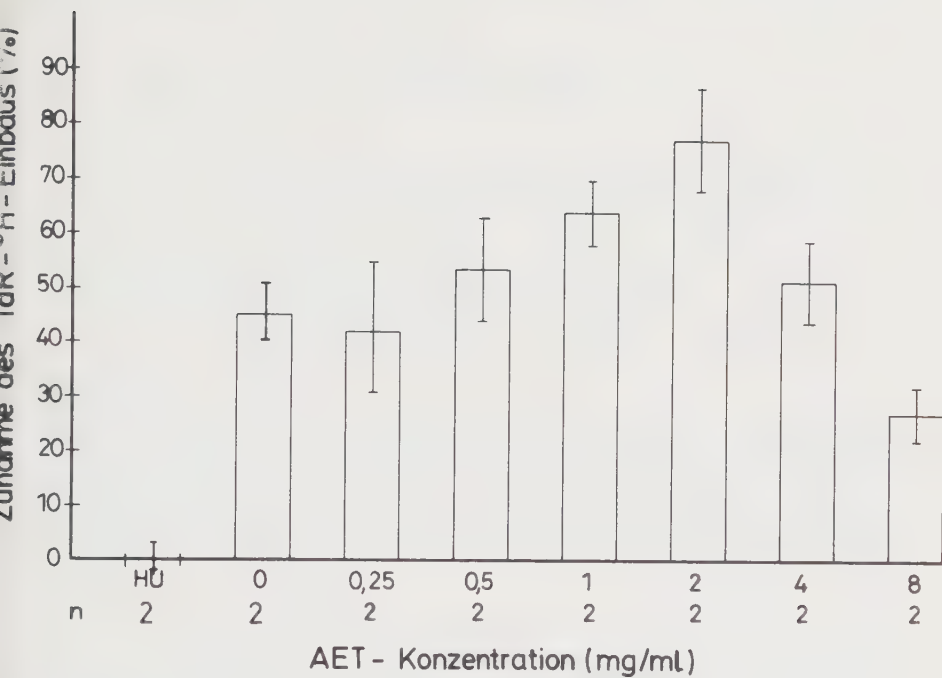
Abb. 19: Zunahme des In vitro - Einbaus von TdR - ^3H von Thymuszellen der Ratte in Gegenwart von 10^{-2} mol/l HU nach 30 min Vorinkubation mit AET konzentrationsabhängig und unmittelbar darauffolgender UV-Bestrahlung (72 Jxm^{-2}).

Konzentrationsstufen:

0 mmol/l (0 mg/ml); 0,889 mmol/l (0,25 mg/ml);
1,779 mmol/l (0,5 mg/ml); 3,558 mmol/l (1 mg/ml);
7,116 mmol/l (2 mg/ml); 14,232 mmol/l (4 mg/ml);
28,465 mmol/l (8 mg/ml)

HU: Hydroxyharnstoff (gleich 0 % gesetzt)

n = Anzahl der Versuche (Dreifachbestimmungen)



4.5 Wirkung der Substanzen auf die unprogrammierte DNA-Synthese mit und ohne UV-Bestrahlung

Die folgenden Versuchsreihen bestehen aus je sechs Einzelsätzen:

1. Mit 10^{-2} mol/l Hydroxyharnstoff
2. Mit 10^{-2} mol/l Hydroxyharnstoff und UV-Bestrahlung ($72 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$)
3. Mit 10^{-2} mol/l Hydroxyharnstoff und 30 min Vorinkubation mit einer Substanz
4. Mit 10^{-2} mol/l Hydroxyharnstoff und 30 min Vorinkubation mit einer Substanz unmittelbar nach UV-Bestrahlung

Die Auswertung erfolgte im t-Test nach STUDENT.

In den nun folgenden Tabellen ist in der ersten Spalte immer der Vergleich der nichtstimulierten, unprogrammierten DNA-Synthese mit der durch UV-Licht stimulierten unprogrammierten DNA-Synthese eingetragen. Die UV-Reparatur betrug in allen Versuchen durchschnittlich ca. 45 % (25 % bis 92 %).

Tab. 1

Unprogrammierter TdR - ^3H - Einbau in die DNA von Thymuszellen der Ratte in Gegenwart von 10^{-2} mol/l Hydroxyharnstoff nach UV-Bestrahlung ($72 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$) und/oder nach 30 min Vorinkubation mit 4,56 mmol/l Cystein.

Die statistische Auswertung erfolgte nach STUDENT's "t-Test". Verglichen wurden jeweils die Mittelwerte von:

1. Kontrolle (HU) mit UV-stimulierter Probe (HU + UV)
2. Kontrolle (HU) mit Substanz und Ansatz (HU + Substanz)
3. UV-stimulierte Probe (HU + UV) mit UV-stimuliertem Substanzansatz (HU + Substanz + UV)

4. Ansatz nach Substanzzusatz (HU + Substanz) mit UV-stimuliertem Ansatz unter Substanzwirkung (HU + Substanz + UV)

$\bar{x}$ = arithmetisches Mittel des TdR - ^3H -Einbaus in Zerfällen
x min $^{-1}$ x mg $^{-1}$ DNA

s_x = Standardabweichung

n = Zahl der Einzelwerte

t = t-Werte

p = Zufallswahrscheinlichkeit der Mittelwertdifferenzen;
p < 0,05 galt als signifikant (s.), p $\geq$ 0,05 galt als nicht signifikant (n.s.)

HU = Hydroxyharnstoff (10^{-2} mol/l)

+UV = mit UV-Bestrahlung (72 J x m $^{-2}$)

Cystein

	HU	HU+UV	HU	HU+Cy
$\bar{x}$	56502	70683	56502	91288
s_x	8307	3464	8307	8485
n	4	5	4	4
t	3,153		5,838	
p	< 0,02 s.		< 0,001 s.	
	HU+UV	HU+Cy+UV	HU+Cy	HU+Cy+UV
$\bar{x}$	70683	99095	91288	99095
s_x	3464	17349	8485	17349
n	5	4	4	4
t	3,631		0,807	
p	< 0,01 s.		> 0,05 n.s.	

Cystein vermehrte den unprogrammierten TdR - ^3H -Einbau in die DNA um 62 %, die UV-stimulierte Inkorporation jedoch nur um 40 %. Die UDS nach Beigabe von Cystein und Einwirkung von UV-Bestrahlung lag um 9 % (nicht signifikant) höher als die UDS unter der Wirkung von Cystein allein (Tab. 1).

Tab. 2

Unprogrammierter TdR - ^3H -Einbau in die DNA von Thymuszellen der Ratte in Gegenwart von 10^{-2} mol/l Hydroxyharnstoff nach UV-Bestrahlung ($72 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$) und/oder nach 30 min Vorinkubation mit 3,25 mmol/l L-Glutathion.

(Auswertung und Erklärung siehe Tab. 1)

L-Glutathion

	HU	HU+UV	HU	HU+GSH
$\bar{x}$	24221	46444	24121	40230
s_x	3873	5745	3873	3742
n	6	6	6	6
t	7,893		7,457	
p	< 0,001 s.		< 0,001 s.	
	HU+UV	HU+GSH+UV	HU+GSH	HU+GSH+UV
x	46444	66644	40230	66644
s_x	5745	13528	3742	13528
n	6	6	6	6
t	3,366		4,597	
p	< 0,01 s.		< 0,001 s.	

Während der TdR - ^3H -Einbau in die UDS durch L-Glutathion um 67 % vergrößert wurde, lag die UV-stimulierte UDS unter GSH-Einfluß nur um 43 % über dem Vergleichswert. Die UDS, kombiniert mit GSH nach UV-Bestrahlung, ergab Werte, die um 66 % über denen lagen, die nur nach GSH-Zugabe gemessen wurden (Tab. 2).

Tab. 3

Unprogrammierter TdR - ^3H - Einbau in die DNA von Thymuszellen der Ratte in Gegenwart von 10^{-2} mol/l Hydroxyharnstoff nach UV-Bestrahlung (72 J x m^{-2}) und/oder nach 30 min Vorinkubation mit 0,037 mmol/l N-Äthylmaleimid.

(Auswertung und Erklärung siehe Tab. 1)

N-Äthylmaleimid

	HU	HU+UV	HU	HU+NEM
$\bar{x}$	53831	85474	53831	12998
s_x	3464	5916	3464	0
n	6	6	6	6
t	11,189		29,255	
p	< 0,001 s.		< 0,001 s.	
	HU+UV	HU+NEM+UV	HU+NEM	HU+NEM+UV
$\bar{x}$	85474	12146	12998	12146
s_x	5916	1000	0	1000
n	6	6	6	6
t	29,929		0,551	
p	< 0,001		> 0,05 n.s.	

N-Äthylmaleimid verminderte in einer Konzentration von 0,02 mmol/l die UDS kaum, die UV-stimulierte UDS wurde dagegen um 36 % gehemmt. Die Werte der UDS mit Beteiligung von NEM und die der UDS unter Mitwirkung von NEM und UV-Bestrahlung waren ungefähr gleich (24561 ; $25839 \text{ Z x min}^{-1} \text{ x mg}^{-1} \text{ DNA}$).

In höherer Konzentration (0,037 mmol/l) hemmte NEM die UDS um 76 % und die UV-stimulierte UDS um 86%. UDS kombiniert mit NEM und UDS unter Mitwirkung von NEM und UV-Bestrahlung ließen keine signifikanten Unterschiede erkennen (Tab. 3, 4).

Tab. 4

Unprogrammierter TdR - ^3H - Einbau in die DNA von Thymuszellen der Ratte in Gegenwart von 10^{-2} mol/l Hydroxyharnstoff nach UV-Bestrahlung ($72 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$) und/oder nach 30 min Vorinkubation mit 0,02 mmol/l N-Äthylmaleimid.

(Auswertung und Erklärung siehe Tab. 1)

N-Äthylmaleimid

	HU	HU+UV	HU	HU+NEM
$\bar{x}$	26327	40514	26327	24561
s_x	913	4000	913	2000
n	6	6	6	6
t	7,769		1,529	
p	< 0,001 s.		> 0,05 n.s.	
	HU+UV	HU+NEM+UV	HU+NEM	HU+NEM+UV
$\bar{x}$	40514	25839	24561	25839
s_x	4000	1732	2000	1732
n	6	6	6	6
t	8,036		1,106	
p	< 0,001 s.		> 0,05 n.s.	

Tab. 5

Unprogrammierter TdR - ^3H -Einbau in die DNA von Thymuszellen der Ratte in Gegenwart von 10^{-2} mol/l Hydroxyharnstoff nach UV-Bestrahlung ($72 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$) und/oder nach 30 min Vorinkubation mit 0,58 mmol/l Metronidazol.

(Auswertung und Erklärung siehe Tab. 1)

Metronidazol

	HU	HU+UV	HU	HU+Met
$\bar{x}$	35992	50558	35992	34839
s_x	1414	7583	1414	4583
n	6	6	6	6
t	4,685		0,576	
p	< 0,001 s.		> 0,05 n.s.	
	HU+UV	HU+Met+UV	HU+Met	HU+Met+UV
$\bar{x}$	50558	46078	34839	46078
s_x	7583	3000	4583	3000
n	6	6	6	6
t	1,371		5,026	
p	> 0,05 n.s.		< 0,001 s.	

Metronidazol zeigte keine signifikante Wirkung auf die UDS, bei der UV-bestrahlten UDS war eine (nicht signifikante) Hemmung von 9% zu sehen. Die mit Metronidazol stimulierte UDS unmittelbar nach UV-Bestrahlung lag um 32% höher als die UDS unter Einwirkung von Metronidazol ohne UV-Bestrahlung (Tab. 5).

Tab. 6

Unprogrammierter TdR - ^3H - Einbau in die DNA von Thymuszellen der Ratte in Gegenwart von 10^{-2} mol/l Hydroxyharnstoff nach UV-Bestrahlung ($72 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$) und/oder nach 30 min Vorinkubation mit 2,04 mmol/l Cytosinarabinosid.

(Auswertung und Erklärung siehe Tab. 1)

Cytosinarabinosid

	HU	HU+UV	HU	HU+araCa
$\bar{x}$	37044	58424	37044	24435
s_x	1414	3317	1414	1414
n	6	6	6	6
t	13,992		15,452	
p	< 0,001 s.		< 0,001 s.	
	HU+UV	HU+araCa+UV	HU+araCa	HU+araCa+UV
$\bar{x}$	58424	42359	24435	42359
s_x	3317	1414	1414	1414
n	6	6	6	6
t	10,513		21,965	
p	< 0,001 s.		< 0,001 s.	

Die UDS allein wurde durch Cytosinarabinosid um 34 % verringert, die UV-stimulierte UDS jedoch nur um 27 %. Die Kombination von araC und UV-Bestrahlung erhöhte die UDS um 73 % gegenüber der Einwirkung von araC allein (Tab. 6).

Tab. 7

Unprogrammierter TdR - ^3H -Einbau in die DNA von Thymuszellen der Ratte in Gegenwart von 10^{-2} mol/l Hydroxyharnstoff nach UV-Bestrahlung (72 J x m^{-2}) und/oder nach 30 min Vorinkubation mit 0,25 mmol/l Ethidiumbromid.

(Auswertung und Erklärung siehe Tab. 1)

Ethidiumbromid

	HU	HU+UV	HU	HU+UV
$\bar{x}$	43364	59118	43364	43703
s_x	4123	9559	4123	7550
n	6	6	6	6
t	3,713		0,096	
p	< 0,01 s.		> 0,05 n.s.	
	HU+UV	HU+EB+UV	HU+EB	HU+EB+UV
$\bar{x}$	59118	40135	43703	40135
s_x	9539	3742	7550	3742
n	6	6	6	6
t	4,559		1,044	
p	< 0,002 s.		> 0,05 n.s.	

Während Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,25 mmol/l die UDS nicht verringerte, erreichte ein Zehntel dieser Konzentration eine Hemmung um 14%. Die UV-stimulierte UDS wurde gleichermaßen um 33% vermindert. Die UDS nach Zugabe von EB und nach UV-Bestrahlung war bei der höheren Konzentration (nicht signifikant) um 8% niedriger und bei der niedrigen Konzentration um 39% höher als die UDS, die nur unter Mitwirkung von EB ablief (Tab. 7, 8).

Tab. 8

Unprogrammierter TdR - ^3H - Einbau in die DNA von Thymuszellen der Ratte in Gegenwart von 10^{-2} mol/l Hydroxyharnstoff nach UV-Bestrahlung ($72 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$) und/oder nach 30 min Vorinkubation mit 0,025 mmol/l Ethidiumbromid.

(Auswertung und Erklärung siehe Tab. 1)

Ethidiumbromid

	HU	HU+UV	HU	HU+EB
$\bar{x}$	46299	83027	46299	39614
s_x	2236	11489	2236	1732
n	6	6	6	6
t	7,658		5,787	
p	< 0,001 s.		< 0,001 s.	
	HU+UV	HU+EB+UV	HU+EB	HU+EB+UV
$\bar{x}$	83027	55200	39614	55200
s_x	11489	6403	1732	6403
n	6	6	6	6
t	5,167		5,755	
p	< 0,001 s.		< 0,001 s.	

Tab. 9

Unprogrammierter TdR - ^3H -Einbau in die DNA von Thymuszellen der Ratte in Gegenwart von 10^{-2} mol/l Hydroxyharnstoff nach UV-Bestrahlung (72 J x m^{-2}) und/oder nach 30 min Vorinkubation mit 10 ug/ml Bleomycin.

(Auswertung und Erklärung siehe Tab. 1)

Bleomycin

	HU	HU+UV	HU	HU+BLM
$\bar{x}$	37690	56508	37690	46642
s_x	1732	3742	1732	2000
n	6	6	6	6
t	11,523		8,952	
p	< 0,001 s.		< 0,001 s.	
	HU+UV	HU+BLM+UV	HU+BLM	HU+BLM+UV
$\bar{x}$	56508	76789	46642	76789
s_x	3742	4000	2000	4000
n	6	6	6	6
t	9,070		16,509	
p	< 0,001 s.		< 0,001 s.	

Der nicht stimulierte, unprogrammierte TdR - ^3H -Einbau wurde durch Bleomycin um 24 %, der UV-stimulierte Einbau um 36% erhöht. Die UDS, die durch BLM und UV-Bestrahlung stimuliert worden war, lag um 65 % höher als die, die nur unter Mitwirkung von BLM ablief (Tab. 9).

Tab. 10

Unprogrammierter TdR - ^3H -Einbau in die DNA von Thymuszellen der Ratte in Gegenwart von 10^{-2} mol/l Hydroxyharnstoff nach UV-Bestrahlung (72 J x m^{-2}) und/oder nach 30 min Vorinkubation mit 0,052 mmol/l Coffein.

(Auswertung und Erklärung siehe Tab. 1)

Coffein

	HU	HU+UV	HU	HU+Co
$\bar{x}$	37640	56587	37640	37209
s_x	1414	4899	1414	3162
n	6	6	6	6
t	9,099		0,304	
p	< 0,001 s.		> 0,05 n.s.	
	HU+UV	HU+Co+UV	HU+Co	HU+Co+UV
$\bar{x}$	56587	55358	37209	55348
s_x	4899	3162	3162	3162
n	6	6	6	6
t	0,516		9,939	
p	> 0,05 n.s.		< 0,001 s.	

Eine signifikante Wirkung auf die nicht stimulierte UDS und auf die UV-bestrahlte UDS ließ sich bei Coffein nicht erkennen. Der unprogrammierte TdR - ^3H -Einbau lag unter dem Einfluß von Coffein und UV-Bestrahlung um 49 % höher als die UDS nach alleiniger Behandlung mit Coffein (Tab. 10).

Tab. 11

Unprogrammierter TdR - ^3H - Einbau in die DNA von Thymuszellen der Ratte in Gegenwart von 10^{-2} mol/l Hydroxyharnstoff nach UV-Bestrahlung (72 J x m^{-2}) und/oder nach 30 min Vorinkubation mit 4,44 mmol/l Diäthylthiocarbamat.

(Auswertung und Erklärung siehe Tab. 1)

Diäthylthiocarbamat

	HU	HU+UV	HU	HU+DDC
$\bar{x}$	34487	50733	34487	19428
s_x	2449	3000	2449	1000
n	6	6	6	6
t	10,632		15,059	
p	< 0,001 s.		< 0,001 s.	
	HU+UV	HU+DDC+UV	HU+DDC	HU+DDC+UV
$\bar{x}$	50733	18058	19428	18058
s_x	3000	1414	1000	1414
n	6	6	6	6
t	25,309		1,474	
p	< 0,001 s.		> 0,05 n.s.	

In Konzentrationen von 4,44 mmol/l, 0,44 mmol/l und 0,044 mmol/l verminderte Diäthylthiocarbamat die UDS gleichbleibend um durchschnittlich 40 %. Bei der UV-stimulierten UDS nahm die Hemmung stetig ab, je kleiner die Konzentration war (64 %, 54 %, 29 %). Ebenso stieg die UDS unter Einwirkung von DDC und UV-Bestrahlung in Relation zum Substanzansatz um 8 % (nicht signifikant), 22 % und 88 % (Tab. 11, 12, 13) umgekehrt proportional zur DDC-Konzentration an.

Tab. 12

Unprogrammierter TdR - ^3H -Einbau in die DNA von Thymuszellen der Ratte in Gegenwart von 10^{-2} mol/l Hydroxyharnstoff nach UV-Bestrahlung ($72 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$) und/oder nach 30 min Vorinkubation mit 0,44 mmol/l Diäthylthiocarbamat.

(Auswertung und Erklärung siehe Tab. 1)

Diäthylthiocarbamat

	HU	HU+UV	HU	HU+DDC
$\bar{x}$	40301	66043	40301	24795
s_x	2828	1732	2828	1000
n	6	6	6	6
t	19,939		12,010	
p	< 0,001 s.		< 0,001 s.	
	HU+UV	HU+DDC+UV	HU+DDC	HU+DDC+UV
$\bar{x}$	66043	30258	24795	30258
s_x	1732	1000	1000	1000
n	6	6	6	6
t	43,854		9,467	
p	< 0,001 s.		< 0,001 s.	

Tab. 13

Unprogrammierter TdR - ^3H -Einbau in die DNA von Thymuszellen der Ratte in Gegenwart von 10^{-2} mol/l Hydroxyharnstoff nach UV-Bestrahlung (72 J x m^{-2}) und/oder nach 30 min Vorinkubation mit 0,044 mmol/l Diäthylthiocarbamat.

(Auswertung und Erklärung siehe Tab. 1)

Diäthylthiocarbamat

	HU	HU+UV	HU	HU+DDC
$\bar{x}$	31476	51499	31476	19507
s_x	1414	2828	1414	1000
n	6	6	6	6
t	15,509		20,743	
p	< 0,001 s.		< 0,001 s.	
	HU+UV	HU+DDC+UV	HU+DDC	HU+DDC+UV
$\bar{x}$	51499	36646	19507	36646
s_x	2828	464	807	464
n	6	6	6	6
t	12,859		45,066	
p	< 0,001 s.		< 0,001 s.	

5. Diskussion

5.1 Zur Methode

5.1.1 Zellmaterial -----

Der Thymus gehört zu den Lymphorganen und unterscheidet sich vom übrigen Lymphgewebe nur durch das Fehlen von Lymphknötchen. Er besteht aus einer Vielzahl von polyedrischen Läppchen, die von lockerem Bindegewebe umgeben sind. Im histologischen Schnittpräparat erkennt man eine dunklere Rindenschicht, bestehend aus Retikulumgewebe mit dichtgedrängten Thymozyten und eine hellere Marksicht mit Retikulumzellen und Hasall'schen Körperchen. Aus den Retikulumzellen können, je nach Gewebereiz, außer den Lymphozyten auch Monozyten, Histiozyten, Plasmazellen und Mastzellen gebildet werden (110). Daraus folgt, daß Thymozytenpräparationen grundsätzlich Zellen unterschiedlicher Struktur und Funktion enthalten. Unabhängig davon verwenden namhafte Arbeitsgruppen (26, 34, 75) Thymozytensuspensionen routinemäßig für biochemische Untersuchungen. Während die vorliegend gewählte Präparationsmethode Bindegewebsanteile und Erythrozyten weitgehend eliminiert, enthält die Restpräparation insbesondere Zellen der lymphozytären Reihe von teilungsaktiven Lymphoblasten bis zu ausdifferenzierten Thymuslymphozyten. Die unter den gewählten Bedingungen nachgewiesene hohe TdR-³H-Einbaurate und ihr zu fast 90% (103) durch Hydroxyharnstoff hemmbarer Anteil (Abb. 3) zeigen in der Tat, daß die untersuchten Zellsuspensionen zahlreiche teilungsaktive Zellen enthielten.

Die Anfärbbarkeit der Zellen mit Toluidinblau ergab - in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe (103) - nur sehr wenig devitalisierte Zellen ($\leq 5\%$). Da zahlreiche Stoffwechselfparameter - wie Poolgrößen (26) - sowie verschiedene chemische und physikalische Effekte auf Thymuszellen zunächst an Zellpräparationen vergleichbarer Zusammensetzung und Qualität gemessen wurden (26, 34, 75), erschien für die vor-

liegenden Untersuchungen der Verzicht auf weitere Zelldifferenzierung vertretbar.

5.1.2 Thymidin-Pool

Als Ausdruck der DNA-Synthese wurde der Einbau von TdR- ^3H in die säurefällbare Fraktion der Thymozytenansätze gewählt. Da unspezifische Effekte (z.B. radiochemische Reaktionen innerhalb des - spezifisch hochmarkierten - Tracers und/oder adsorptive Bindung von TdR- ^3H in Kontroll- und Versuchswerte gleichermaßen eingehen, bleibt als Fehlermöglichkeit im Zusammenhang mit der Bewertung des TdR- ^3H -Einbaus die insbesondere substanzspezifische Veränderung des endogenen, inaktiven TdR-Pools. Er liegt bei Thymozyten der Maus in der Größenordnung von einigen nmol/ 10^9 Zellen (26) und ist somit relativ klein. Während Veränderungen endogener Pool-Größen keinesfalls vernachlässigt werden dürfen, wo quantitative Aussagen über Stoffwechselleistungen verlangt werden, erscheint es aus folgenden Gründen unwahrscheinlich, daß Expansion oder Kontraktion des TdR-Pools die vorgelegten Ergebnisse - zumindest ihrer Richtung nach - beeinflußt haben:

1. UV-Bestrahlung hemmt die replikative DNS-Synthese (25, 65), was zumindest kurzfristig zu einer Expansion des endogenen TdR-Pools und damit zu einer Verdünnung des markierten TdR führen könnte. Tatsächlich aber erhöhte sich der Einbau von TdR- ^3H in die Thymozyten-DNA nach Einwirkung von UV-Licht (Abb. 5, 6, Tab. 1-13). Auf Verdünnung des angebotenen TdR- ^3H könnte allenfalls der abfallende Teil der in Abb. 6 dargestellten UV-Dosis-Wirkungs-Kurve hinweisen. Entsprechende Überlegungen gelten auch für Ethidium, Bleomycin und Aminothiole.
2. Es gibt bisher keine Hinweise darauf, daß Aminothiole den TdR-Pool - unter den Bedingungen des Kurzzeitversuchs - verändern (6, 22, 37, 59, 94, 95, 96, 97).

3. Nach Art der Wirkung von NEM ist mit einer Verkleinerung des Vorstufen-Pools (Hemmung des Energiestoffwechsels) und somit mit Erhöhung des Tracer-Einbaus zu rechnen. Der TdR-³H-Einbau war demgegenüber vermindert.

5.1.3 TdR-³H-Einbau in Gegenwart von Hydroxyharnstoff

Die durch DNA-Schäden ausgelöste DNA-Reparatur beträgt ca. 2 - 3 % der semikonservativen DNA-Synthese und tritt im Syntheseansatz methodisch ohne Hemmung der SDS daher nicht in Erscheinung. Zu den wesentlichsten Voraussetzungen des biochemischen Nachweises von DNA-Excisions-Reparatur gehört somit die spezifische und quantitative Hemmung der replikationsbezogenen DNA-Synthese. Die unprogrammierte DNA-Synthese muß durch diese Hemmung unbeeinflusst bleiben. Diese Bedingungen können gegenwärtig nur näherungsweise erfüllt werden, wie sich am Beispiel von HU zeigt: Die Substanz hemmt vorwiegend den semikonservativen TdR-³H-Einbau. CLEAVER (19) hielt als erster den Nachweis für erbracht, daß HU die DNA-Reparatur nach Einwirkung von UV-Licht nicht beeinträchtigt. Ihm widersprechen in letzter Zeit mehrere Autoren, die zeigen konnten, daß HU unter bestimmten Bedingungen DNA-Reparaturvorgänge beeinflusst. Es wurden sowohl Hemmung (21, 31) als auch Förderung (4, 17) der DNA-Reparatur nachgewiesen. Eine Hemmung der DNA-Reparatur wurde vorliegend erst bei Konzentrationen von mehr als 2×10^{-2} mol/l deutlich. Inzwischen ist davon auszugehen, daß HU zumindest zwei voneinander unabhängige Wirkungen auf Zellen ausüben kann (103): In kleineren Konzentrationen inhibiert HU durch Wechselwirkung mit dem Nucleotid-reductase-System die DNA-Synthese; höhere Konzentrationen können in vitro zum Zelltod führen, wobei folgender Wirkungsmechanismus wahrscheinlich gemacht werden konnte: HU besitzt eine freie -NH-OH-Gruppe, die in wässrigen Lösungen zu freien Radikalen und H₂O₂ metabolisiert werden kann. Radikale können mit fast allen Makromolekülen der Zelle (etwa der DNA) reagieren und so den Zelltod herbeiführen. Der zu Radikalen

umgewandelte HU-Anteil fällt allerdings nur dann ins Gewicht, wenn die entsprechende Stoffwechsel-Aktivität des Ansatzes gegeben ist (4). In diesem Fall induziert HU selbst DNA-Schäden und DNA-Reparatur. Unter den angedeuteten Gesichtspunkten muß die Frage nach der Bedeutung von HU für die quantitative Messung der UDS offenbleiben (51). Einigkeit zwischen den Autoren besteht allerdings dahingehend, daß der Zusatz von HU zumindest semiquantitative Aussagen über das Verhalten der DNA-Excisions-Reparatur erlaubt, da der Substanzfehler in Kontroll- und Versuchsansätzen in der Regel mit vergleichbaren Anteilen eingeht.

Eine Übertragbarkeit von einer bestimmten Zellart auf eine andere ist aus den o.a. Gründen nur bedingt möglich, wie sich bereits am Beispiel der Lymphozyten ergibt. Der ^3H -Thymidineinbau in die DNA von Lymphozyten steigt nach Bestrahlung bzw. chemischer Behandlung an, nicht aber der Einbau anderer Basen, obwohl alle Basen an der Ausschnittsreparatur beteiligt sind. Abgesehen davon unterliegt der Ablauf der DNA-Reparatur nach Art, Induzierbarkeit, Umfang und Zeitabhängigkeit zelltypenspezifischen Unterschieden, die in jedem Falle neu ermittelt werden müssen (18, 65, 102, 104). Der durch Bestrahlung von Rattenthymozyten durch UV-Licht ausgelöste unprogrammierte Einbau von $\text{TdR-}^3\text{H}$ in die DNA war bei einer Dosis von 72 Jm^{-2} mit 75 % maximal (Abb. 5). Liegen Substanzeffekte deutlich über der durch UV-Licht erreichbaren $\text{TdR-}^3\text{H}$ -Einbauquote (wie z.B. GSH), sind Sekundäreffekte (etwa die Reaktion solcher Substanzen mit HU) und damit Fehlinterpretationen nicht auszuschließen (18, 102).

5.1.4 Inkubationsbedingungen

Der semikonservative $\text{TdR-}^3\text{H}$ -Einbau in die DNA stieg proportional zur $\text{TdR-}^3\text{H}$ -Konzentration an.

Entsprechendes gilt, wie bereits in anderem Zusammenhang an Milzlymphozyten gezeigt werden konnte, auch für den durch UV-

Licht stimulierten TdR-³H-Einbau in Gegenwart von HU (103).

Um den Umgang mit Radioaktivität möglichst gering zu halten, wurde beim SDS-Versuch daher mit geringeren TdR-³H-Vorlagen (1,25 μ Ci) gearbeitet als beim UDS-Versuch (5 μ Ci pro 1 ml Zellsuspension). Als Inkubationszeit wurden 45 min gewählt, da hier der TdR-³H-Einbau zwar noch anstieg, aber bald danach eine Sättigungsgrenze erreichte. Außerdem sollte der TdR-³H-Einbau zeitlich möglichst weit entfernt vom Bereich des erneuten TdR-³H-Anstiegs (ab 90 min) gemessen werden, welcher auf Sekundäreffekte hinweist. Da die SDS-Ansätze einen pH-Wert von 7,4 und die UDS-Inkubate einen solchen von 7,8 (HU erhöhte den pH-Wert der HANK's-Lösung um 0,4) aufwiesen und einige der untersuchten Substanzen zur pH-Verschiebung führten, wurde auch der Einfluß des pH-Wertes auf die DNA-Synthese untersucht. Im Bereich von pH 8,2 bis 6,6 zeigten sich keine signifikanten Wirkungen. Höhere pH-Abweichungen wurden mit Salzsäure bzw. Natronlauge reguliert.

5.2 Zur Wirkung der untersuchten Substanzen

Einen Überblick über die Wirkungen aller untersuchten Substanzen zeigt Tabelle 14.

Tab. 14: Überblick der Wirkungen aller untersuchten Substanzen

S D S	=	semikonservative DNA-Synthese
U D S	=	unprogrammierte DNA-Synthese
+	=	Förderung
-	=	Hemmung
o	=	keine signifikante Wirkung
+o bzw.		
o-	=	keine signifikante Wirkung, aber mit Tendenz zur Förderung bzw. Hemmung

Tabelle 14

	S D S			U D S			UV-stimulierte U D S		
	I niedr. Konz.	II mittl. Konz.	III hohe Konz.	I niedr. Konz.	II mittl. Konz.	III hohe Konz.	I niedr. Konz.	II mittl. Konz.	III hohe Konz.
A E T	0	0-	-	0	+	+0	+	+	+
Cystein	0	-	-	+	+	+0		+	
L - Glutathion	0	0-	-	0	+	+			
N - Äthylmaleimid	-	-	-	-	-	-	-		-
Metronidazol	0	0	0	0	0	0			-
Cytosinarabinosid	-	-	-	0	0	-			-
Ethidiumbromid	0	0-	-	0	0	-	-	-	
Bleomycin	0	0	0-	+	+	+		+	
Coffein	0	0	0	0	+0	+0			0
Diäthylthio- carbammat	0	-	-	0	-	-	-	-	-

5.2.1 Aminothiole

Verschiedene Autoren berichten, daß Aminothiole in Konzentrationen von 1 - 60 mmol/l bzw. 100 - 200 mg (mmol)/kg K.-gew. in vitro und in vivo die semikonservative DNA-Synthese hemmen und die Mitoseaktivität vermindern (7, 23, 35, 39, 44, 56, 62, 95, 96, 97). Den vorgelegten Ergebnissen zufolge ist dieser Befund auch auf Rattenthymozyten übertragbar (Abb. 8, 9, 10). Für die untersuchten Aminothiole lagen die wirksamen Konzentrationen in einem Bereich von einigen mmol pro Liter Zellsuspension. Alle Hemmeffekte verhielten sich dosisabhängig. Im Unterschied dazu wurde der unprogrammierte TdR-³H-Einbau in die Thymozyten-DNA durch AET, Glutathion-SH und Cystein bis zu einem Maximaleffekt (substanzspezifisch in der Größenordnung von 35 - 83%) erhöht. Jenseits dieses Dosisoptimums ergab sich Wirkungsumkehr (Abb. 8, 9, 10). Da die im UDS-System wirksamen Konzentrationen deutlich unter den Substanzkonzentrationen lagen, die zu einer Hemmung der DNA-Synthese führten, folgt, daß die Erhöhung des reparaturbedingten Tracer-Einbaus den empfindlicheren Parameter darstellt.

Wenn es erlaubt ist, schon jetzt an den Bleomycin-Effekt zu erinnern, so liegt der Analogieschluß nahe, daß Aminothiole unter den gewählten Bedingungen gleichfalls zu DNA-Strangbrüchen führen und dadurch die DNA-Reparatur auslösen. In der Tat konnten KUHLEIN et al. (48) nachweisen, daß Cystein in vitro in Konzentrationen von 10 - 50 mmol/l Strangbrüche auslöst. Da der von den genannten Autoren als Mechanismus postulierte Autooxidationsmechanismus (mit der Konsequenz des Entstehens von Hydroxy-Radikalen) auch für andere Thiole und Aminothiole gilt, ist es nicht überraschend, wenn PITRA et al. (81) beispielsweise an Hamsterzellkulturen auch für Cysteamin (50 mmol/l) DNA-Abbau nachweisen. Wenn über Hemmung von DNA-Reparatur durch Aminothiole berichtet wird (so MODIG et al. 64), ist zu bedenken, daß ein solcher Effekt auch durch die zusätzliche aminothiolbedingte Bildung

von Strangbrüchen vorgetäuscht sein kann. Die Bedeutung der Aminothiolwirkung auf die DNA für die Erklärung des chemischen Strahlenschutzes muß weiterhin offenbleiben. NAKANO et al. (70) beispielsweise formulieren für die Erhöhung der Reparaturkapazität von V79-Zellen des Chinesischen Hamsters durch geeignete Konditionierung des Nährmediums die folgende Hypothese: "The observed reduction in killing and mutation as a result of postincubation in conditioned medium, which delays DNA replication, would be interpreted as evidence that conditioned medium provides a longer period of time for an error-free excision-repair process, leaving lesion in DNA available for error-prone post-replication repair."

5.2.2 Äthylmaleimid und Metronidazol

N-Äthylmaleimid hemmte gleichermaßen SDS und UDS. Eine geringe Aktivierung des Reparaturvermögens bei 0,022 mmol/l im Vorversuch konnte statistisch nicht bestätigt werden. Auch der UV-Repair wurde durch diese Substanz offensichtlich blockiert (Abb. 11). Dieser auch in anderem Zusammenhang erhaltene Befund (9, 93) findet möglicherweise seine Erklärung (9, 93) darin, daß NEM die Polymerase α hemmt, sich über die NH_2 -Gruppe unmittelbar mit der DNA verbindet (98) und überdies die an der DNA-Synthese beteiligten SH-abhängigen Reaktionsschritte blockiert (15). Zusätzlich wird die DNA durch die dem N-Äthylmaleimid eigene Elektronenaffinität sensibilisiert (2), die wiederum zur Auflösung der Helixstruktur und zu Strangbrüchen führt.

Metronidazol zeigte im untersuchten Konzentrationsbereich keinen signifikanten Einfluß auf den DNA-Stoffwechsel. Eine Hemmung der DNA-Reparatur deutete sich bei hohen Konzentrationen an. Auch die UV-Reparatur wurde kaum beeinträchtigt (Abb. 12, Tab. 5). Ebenso ergaben die Untersuchungen von LAMBERT et al. (50) sowie MAGDON und SCHRÖDER (55), daß diese Substanz keinen signifikanten Einfluß auf DNA-Synthese und

DNA-Reparatursynthese ausübt. Da Metronidazol nur im reduzierten Zustand wirksam ist (45, 73), widerspricht dieses Ergebnis nicht den in der Literatur beschriebenen Effekten. Metronidazol ist für Anaerobier insbesondere deshalb toxisch, weil diese Elektronentransferproteine besitzen, welche die Nitrogruppe der Substanz reduzieren können. Nur das reduzierte Metronidazol kann mutagen wirken. Es verbindet sich in dieser Form-elektronenaffin - mit der DNA, induziert wie NEM Strangbrüche, löst die Helixstruktur auf und führt zur "Degeneration" des Makromoleküls (30).

5.2.3 Cytosinarabinosid

Hemmung der DNA-Synthese durch Cytosinarabinosid ist aus der Literatur bekannt (8, 9, 29, 66). Während die semikonservative DNA-Synthese von Rattenthymozyten bereits durch sehr kleine Konzentrationen des Antimetaboliten (0,004 mmol/l) gehemmt wurde, blieb der TdR-³H-Einbau in Gegenwart von Hydroxyharnstoff auch bei solchen Substanzkonzentrationen unbeeinflusst, welche um Größenordnungen über den im SDS-Versuch wirksamen Zusätzen lagen. Die wahrscheinlichste Erklärung für diesen Befund ist in den Ergebnissen von WAWRA und DOLEJS (105) zu sehen, welche zeigen konnten, daß ara C über einen weiten Konzentrationsbereich (10^{-5} - 10^{-3} mol/l) vor allem die DNA-Polymerase α hemmt, während die Aktivität der DNA-Polymerase β unter den gleichen Bedingungen nicht oder deutlich geringer beeinflusst wird. Da sich die Aktivität der DNA-Polymerase α vor allem auf die SDS, jene der Polymerase β dagegen insbesondere auf die UDS richtet (93, 105), bietet der Einsatz des Antimetaboliten eine methodische Möglichkeit zur Unterscheidung beider Enzymmechanismen an intakten Zellpräparationen. BERGER et al. (9) andererseits sind der Meinung, daß die Polymerase α sehr wohl einen starken Anteil an Reparaturvorgängen besitzt, und DUNN und REGAN (29) beschreiben eine Hemmung von DNA-Polymerasen durch ara C, die mit der

UV-induzierten Ausschneidungsreparatur zusammenhängen. Durch höhere ara C - Konzentrationen wird allerdings immer auch die DNA-Reparatur gehemmt (9, 29, 40, 106, 107).

Cytosinarabinosid wird in die DNA eingebaut und ist oft am Ende einer neusynthetisierten DNA zu finden (8, 83). Die DNA-Reparatur dürfte somit während des Polymerisations-schritts gehemmt werden, so daß sich Strangbrüche akkumulieren können. Außerdem soll ara C durch Verdrehung der DNA-Helixstruktur die Reparatur von Einzelstrangbrüchen behindern (40). Das Fehlen von DNA-Vorstufen bei Behandlung mit der Substanz scheint demgegenüber für den Ablauf des reparaturbedingten TdR-³H-Einbaus in die DNA im Kurzzeitversuch von untergeordneter Bedeutung zu sein (40).

5.2.4 Ethidium

Ethidiumbromid reduzierte in hohen Konzentrationen die semi-konservative und unprogrammierte DNA-Synthese (Tab. 7, 8). Die Verbindung schiebt sich zwischen zwei Basenpaare und verdreht - zumindest in höheren Konzentrationen - die DNA-Helix so stark, daß DNA-Synthese und DNA-Reparatur gehemmt werden (3, 55, 57). Eine DNA-Reparatur ist aber offensichtlich auch dann noch möglich, wenn die DNA-Replikation schon blockiert ist, was - ähnlich wie im Fall von ara C - über die von anderen Autoren angenommene bevorzugte Hemmung der DNA-Polymerase α -Aktivität erklärt werden könnte. Von Konzentrationen über 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ an hemmt Ethidiumbromid die Polymerase α und β (3); dies erklärt die Hemmung von SDS und UDS durch die Substanz in hohen Konzentrationen.

5.2.5 Bleomycin

Bleomycin hemmt in Konzentration um 500 µg/ml die DNA-Synthese durch Induktion von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen (68, 91, 99, 100). Da in vielen Versuchen aber relativ wenig Chromosomenschäden und kaum Chromosomenaberrationen auftraten (99), wurde postuliert, daß zumindest ein wesentlicher Teil der Bleomycin-Schäden von den Zellen sehr rasch repariert wird. Als molekularbiologische Erklärung für das Phänomen wurde die Hypothese vertreten, daß dieses Antibiotikum durch Strangbrüche die DNA-Polymerase β aktiviert und dadurch das Reparatursystem stimuliert (20). Es scheint eine "Balance" zwischen Hemmung der DNA-Synthese und Aktivierung der unprogrammierten DNA-Synthese in höheren Konzentrationen zu geben (92), da Bleomycin unter anderem in höheren Konzentrationen die DNA-Polymerase β wiederum hemmt (68). Eine Induktion der UDS durch Bleomycin kann durch ATP verstärkt werden (68). Die semikonservative DNA-Synthese wurde durch Bleomycin im untersuchten Konzentrationsbereich vorliegend kaum beeinflusst. Demgegenüber erhöhte sich die DNA-Reparatur mit steigender Konzentration (bei 10 mg/l betrug der DNA-Repair 24 %). Auch das UV-Reparaturvermögen wurde - ähnlich wie beim Glutathion - stark aktiviert.

5.2.6 Coffein

Coffein hemmt die cAMP-Phosphodiesterase, die die Umwandlung von 3', 5' - cAMP in Adenosin-5' - monophosphat katalysiert. Die Vermutung, daß ein zellulärer Anstieg von cAMP die DNA-Synthese stimuliert (52), konnte weder durch die Untersuchungen von GRIFFITHS et al. (36) und LEHNERT (53) noch durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden.

Während ein Einfluß von Coffein auf intakte DNA wenig wahrscheinlich ist, werden Effekte auf geschädigte DNA und deren Reparatur (wie Vereinigung von DNA-Strangbrüchen, Ausschnitts-

reparatur, Rekombinationsreparatur, Teilungsverzögerung, Überleben und Mutagenität) nicht grundsätzlich ausgeschlossen (36, 52, 53, 89, 109). Tatsächlich erhöhte die Substanz in nichttoxischen Konzentrationen die chromosomenschädigende Wirkung von 7-Bromomethylbenz(a)-athracen um ein mehrfaches (32). Da Coffein unter den gleichen Bedingungen die Ligationsrate von neusynthetisierter DNA verminderte und Strangbrüche induzierte, wurde vermutet, daß die Verbindung durch Hemmung von Postreparaturschritten zu dauernden Lücken in neu entstehenden DNA-Strängen führt. Die Ausschnittsreparatur bleibt ungestört, wie sich aus den Untersuchungen von APFELZWEIG und TEPLITZ(109) und dem vorliegenden Befund ergab: Im Vorversuch ließ sich die unprogrammierte DNA-Synthese durch Coffein geringfügig (bis ca. 20%) stimulieren (Abb. 16). Diese Wirkung konnte allerdings an einem repräsentativen Stichprobenumfang bei der im Vorversuch wirksamen Konzentration von 0,052 mmol/l nicht bestätigt werden. Ebenso wenig war ein Einfluß der Substanz auf die UV-Reparatur zu erkennen (Tab. 10).

5.2.7 Diäthylthiocarbamat

Die semikonservative DNA-Synthese wurde durch Diäthylthiocarbamat in mäßigem Umfang konzentrationsabhängig reduziert. Die UDS zeigte im Vorversuch erst bei der höchsten Konzentration eine Hemmung von 20 %. Bei weitergehenden Versuchen war zu erkennen, daß diese Substanz im Bereich von 0,044 mmol/l bis 4,44 mmol/l die DNA-Reparatur gleichbleibend um ca. 40 % hemmte. Die Inhibierung der UV-Reparatur verhielt sich demgegenüber konzentrationsabhängig.

Diäthylthiocarbamat hemmt die Superoxiddismutase, die als "Scavenger" von Superoxidradikalen wirkt und in allen sauerstoff-metabolisierenden Zellen gegenwärtig ist (14, 61). Da O_2 -Radikale auch bei Absorption von ionisierenden Strahlen auftreten können (22, 37), waren Untersuchungen über die strahlenbiologische Bedeutung des Enzyms naheliegend: So

wird die außerordentliche Strahlenresistenz von Erythrozyten neuerdings auch auf ihren hohen Gehalt an Superoxiddismutase zurückgeführt (101). Eine radioprotektive Wirkung des Enzyms zeigte sich an Lymphozytenkulturen (71), wenn Superoxiddismutase in Konzentrationen von 5×10^{-3} - 5×10^{-1} mg/ml unmittelbar nach der Bestrahlung dem Medium zugegeben worden war. Ähnliche Wirkungen wurden auch an anderen Zelltypen nachgewiesen (78). Es sollte somit möglich sein, Zellen mit DDC zu sensibilisieren, da die Substanz die Superoxiddismutase inaktiviert. Diäthylthiocarbamat ist ein Metallchelator mit biphasischer Toxizität (88), der, in Abhängigkeit der Konzentration, einmal über Reaktion mit Zink-Metalloenzym die Zelle insgesamt schädigt, zum anderen über Reaktion mit dem Kupfer-Metalloenzym die Superoxiddismutase hemmt. Es muß somit offenbleiben, ob diese Substanz das Reparaturvermögen der Zellen indirekt oder direkt beeinträchtigt.

5.3 Schlußfolgerungen und Ausblick

Ein Überblick über die erhaltenen Ergebnisse zeigt, daß Aminothiole in einem bestimmten Konzentrationsbereich die semikonservative DNA-Synthese von Rattenthymozyten hemmen und den unprogrammierten TdR- ^3H -Einbau aktivieren. Zur Aktivierung der Ausschnittsreparatur waren geringere Konzentrationen erforderlich als zur Hemmung des semikonservativen Thymidineinbaus (Abb. 3). Analoge Verhältnisse ergaben sich mit Bleomycin, dessen zelluläre Effekte sich im allgemeinen synergistisch zur biologischen Wirkung von ionisierenden Strahlen verhalten (69). Da sich die "radiomimetische" Wirkung der Aminothiole - zumindest in vitro - im strahlenschutzwirksamen Konzentrationsbereich bewegen, liegt es nahe, den genannten Effekt in die Erklärung des chemischen Strahlenschutzes durch Aminothiole einzubeziehen. Verschiedene Autoren vertreten die Hypothese, daß die Verlängerung des Reparaturvorganges bei gleichzeitiger - reversibler - Hem-

mung der semikonservativen DNA-Synthese den Anteil fehlerhafter Reparaturschritte vermindert und in diesem Sinn die Reparaturkapazität der Zellen insgesamt erhöht (6, 95). Auch in anderem Zusammenhang ließ sich mit der vorliegend gewählten Methode zum Nachweis von DNA-Reparatur eine Beziehung zwischen der Empfindlichkeit von Milz- und Thymuszellen gegenüber UV-Licht und Röntgenstrahlen einerseits und der jeweiligen Reparaturkapazität andererseits aufweisen (103). Der unter diesem Gesichtspunkt zu fordernde Strahlenschutzeffekt von Bleomycin mag deshalb nicht zum Tragen kommen, weil die Substanz über ihre Wechselwirkung mit der DNA hinaus länger anhaltende und - zumindest partiell - irreversible Veränderungen in den behandelten Zellen auslösen kann (69). Demgegenüber ordnen sich die beobachteten Effekte von Äthylmaleimid, Cytosin-arabinosid, Ethidium und Coffein zwanglos in die gegenwärtigen Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus der Substanzen ein.

Strahlenschutz durch Hemmstoffe der cAMP-Phosphodiesterase (LEHNERT 1979) sowie durch Cytosinarabinosid (PHELPS u. BLACKED, 1979) waren in einzelnen Untersuchungen und unter sehr spezifischen Bedingungen nachweisbar. Als Erklärung wurden im ersteren Fall - naheliegenderweise - eine Erhöhung des cAMP-Spiegels, im letzteren Fall zellkinetische Modelle vorgeschlagen.

Obwohl es naheläge, die strahlensensibilisierende Wirkung von Diäthylethiocarbamat (88, 101) über Hemmung von DNA-Reparaturvorgängen durch Inaktivierung der Superoxiddismutase zu erklären, wird man zunächst einen unspezifischeren Mechanismus - etwa die Komplexbildung mit zweiwertigen Kationen - in Betracht ziehen müssen.

Am Beispiel von Rattenthymozyten verdeutlichen die vorliegenden Untersuchungen somit eine weitere Hypothese zur Erklärung der radioprotektiven Wirkung von Aminothiolen. Synergismen zwischen ionisierenden Strahlen und strahlensensibilisierenden Stoffen müssen noch stärker als bisher unter

dem Gesichtspunkt einer Hemmung von DNA-Reparatursystemen gesehen werden. Schließlich eröffnen quantitative Unterschiede zwischen der semikonservativen DNA-Synthese und dem reparaturbedingten Einbau von TdR-³H -in bezug auf die Effekte von Cytosinarabinsid und Ethidium - die auch von anderen Autoren herausgestellte (9, 20, 93, 105) - Möglichkeit, zumindest orientierende Aussagen über die Beteiligung der DNA-Polymerase α bzw. DNA-Polymerase β an Reparaturschritten zu gewinnen. Weitere einschlägige Untersuchungen sind naheliegend. Dazu gehören u.a.

- vergleichbare Untersuchungen an gereinigten Zellpopulationen (etwa reinen T- und B-Zellen)
- die Frage der interzellulären Übertragbarkeit von Ergebnissen
- die Einbeziehung zusätzlicher Methoden zum Nachweis von Reparaturvorgängen (etwa der säulenchromatographische, filter- oder sedimentationsanalytische Nachweis von DNA-Fraktionen unterschiedlicher Molekülgröße)
- die Berücksichtigung zusätzlicher physikalischer und/oder chemischer Effektoren (wobei dem Superoxiddismutase-System große Bedeutung zukommen dürfte) und
- die Übertragbarkeit von in vitro erhaltenen Befunden auf in vivo - Verhältnisse.

6. Zusammenfassung

1. An Rattenthymozyten wurde die Wirkung von Cystein, L-Glutathion, AET, N-Äthylmaleimid, Metronidazol, Cytosinarabinosid, Ethidiumbromid, Bleomycin, Coffein und Diäthylthiocarbamat auf den semikonservativen und unprogrammierten Einbau von tritiummarkierten Thymidin in die DNA in vitro untersucht.
2. Der semikonservative Einbau von ^3H -Thymidin wurde durch AET (7,1 mmol/l^{*}), Cystein (2,3 mmol/l^{*}), L-Glutathion (4,9 mmol/l^{*}), N-Äthylmaleimid (0,02 mmol/l^{*}), Cytosinarabinosid (0,0004 mmol/l^{*}), Ethidiumbromid (0,25 mmol/l^{*}), Bleomycin (500 µg/l^{*}) und Diäthylthiocarbamat (4,4 mmol/l^{*}) gehemmt. Metronidazol und Coffein blieben ohne Wirkung.
3. Aminothiole (1,1 - 1,8 mmol/l^{*}) und Bleomycin (100 µg/l^{*}) stimulierten, Cytosinarabinosid (2,04 mmol/l^{*}), N-Äthylmaleimid (0,03 mmol/l^{*}), Ethidiumbromid (1,3 mmol/l^{*}) und Diäthylthiocarbamat (8,9 mmol/l^{*}) hemmten den unprogrammierten ^3H -Thymidin-Einbau. Zwischen dem nicht durch UV-Licht und dem durch Bestrahlung mit UV-Licht ausgelösten unprogrammierten Tracer-Einbau bestand hinsichtlich der Wirkung der genannten Substanzen kein grundsätzlicher Unterschied.
4. Aus den Ergebnissen wird geschlossen:
 - a) Die Aminothiolwirkung auf die DNA-Exzisionsreparatur stützt die Annahme, wonach Verlängerung des Reparaturvorganges bei gleichzeitiger Hemmung der semikonservativen DNA-Synthese die Reparaturkapazität von Zellen erhöht.
 - b) Die Effekte der übrigen Substanzen stehen mit den gegenwärtigen Vorstellungen zu ihrem Wirkungsmechanismus im Einklang.

- c) Unspezifische Effekte (Komplexbildung) und spezifischere Wirkungen (Hemmung der Superoxiddismutase) sind bei der Erklärung des Einflusses von Diäthylthiocarbamat unter den gewählten Bedingungen nicht voneinander differenzierbar.

*) Angabe der kleinsten wirksamen Konzentration

Summary

Action of some radioprotective and radiosensitizing compounds on the semiconservative and unscheduled DNA-synthesis of rats thymocytes

1. The effect of cysteine, glutathione, AET, N-ethylmaleimide, metronidazole, cytosine arabinoside, ethidiumbromide, bleomycin, caffeine and diethyldithiocarbamate on the semiconservative and unscheduled insertion of ^3H -methylthymidine (TdR - ^3H) into the DNA was tested on rat thymocytes in vitro.
2. The semiconservative incorporation of TdR- ^3H was inhibited by AET (7,1 mmol/l^{*}), cysteine (2,3 mmol/l^{*}), glutathione (4,9 mmol/l^{*}), N-ethylmaleimide (0,02 mmol/l^{*}), cytosine arabinoside (0,0004 mmol/l^{*}), ethidiumbromide (0,25 mmol/l^{*}), bleomycin (500 ug/l^{*}) and diethyldithiocarbamate (4,4 mmol/l^{*}). Metronidazole and caffeine had no effect.
3. Amino thiols (1,1 - 1,8 mmol/l^{*}) and bleomycin (100 ug/l^{*}) stimulated, cytosine arabinoside (2,04 mmol/l^{*}), N-ethylmaleimide (0,03 mmol/l^{*}), ethidiumbromide (1,3 mmol/l^{*}) and diethyldithiocarbamate (8,9 mmol/l^{*}) decreased the unscheduled TdR- ^3H incorporation. There was no substantial difference in the effect of the substances concerning the tracer incorporation with or without exposure to UV-rays.
4. The results lead to the following conclusions:
 - a) The amino thiol - effect on the excision repair suggest that inhibition of the semiconservative DNA-synthesis will amplify regenerative capacity of the cells.
 - c) The effect of most substances investigated accord with the present views on their mechanisms of action.

- c) The present investigations do not allow an explanation of the influence of diethyldithiocarbamate unspecific effects (such as complexing activity) and more specialized reactions (such as inhibition of superoxide dismutase) must be kept in mind.

*) always giving the smallest effective concentration of the substance

7. Literaturverzeichnis

- 1 Ainsworth, P.J., M.Channon, R.Sridhar and B.Gushulak:
Effect of radiosensitizing agents on electron transport systems.
Can.J.Biochem. 56, 457 - 461 (1978)
- 2 Alper, T.:
Radiosensitization of hypoxic cells by other compounds. pp.71 - 86 in:
Cellular Radiobiology, Cambridge, London, New York, Melbourne, Cambridge University Press 1979
- 3 Altmann, H., H.Tauschl, E.Wawra, J.Dolejs, W.Klein and A.Wottawa:
Inhibition of DNA repair by chemical and biological agents.
pp. 39 - 46 in: Modification of radiosensitivity of biological systems
Vienna, Intern.Atomic Energy Agency 1976
- 4 Andrae, U. and H.Greim:
Induction of DNA repair replication by hydroxyurea in human lymphoblastoid cells mediated by liver microsomes on NADPH.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 87, 50 - 58 (1979)
- 5 Antoku, S.:
Chemical protection against radiation induced DNA single strand breaks in cultured mammalian cells
Radiat. Res. 65, 130 - 138 (1976)
- 6 Bacq, Z.M. and R.Goutier:
Mechanisms of action of sulfur-containing radio-protectors in: Recovery and Repair Mechanisms in Radiobiology.
Brookhaven Symp.Biol. 20, 241 - 261 (1967)
- 7 Baugnet - Mathieu, L., R.Goutier and C.Baes:
Comparative sensitivity of nuclear and mitochondrial DNA synthesis to X-irradiation and to the administration of a sulfhydryl radioprotector (AET) in normal and regenerating rat liver.
Biophys. J. 6, 357 - 366 (1970)

- 8 Bell, D.E. and A.Fridland:
Mode of action of 9- β -D-arabinosyladenine and 1- β -D-arabinosylcytosine on DNA-synthesis in human lymphoblasts.
Biochim.Biophys.Acta 606, 57 - 66 (1980)
- 9 Berger, N.A., K.K.Kurohara, S.J.Petzold and G.W.Sikorski:
Aphidicolin inhibits eukaryotic DNA replication and repair: Implication for involvement of DNA polymerase α in both processes.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 89, 218 - 225 (1979)
- 10 Bishun, N.P., N.Valera and D.C.Williams:
The effect of bleomycin on rat bone marrow cells.
Cytobios 23, 177 - 185 (1978)
- 11 Birnboim, H.C. and M.C.Paterson:
Preferential incorporation of ^3H -thymidine into polypyrimidine - containing regions in DNA following ultraviolet irradiation of human cells.
J.Mol.Biol. 121, 561 - 566 (1978)
- 12 Buddecke, E.:
6. Nucleinsäuren. p. 90 in: Grundriß der Biochemie, Berlin, New York, Walter de Gruyter & Co. 1974
- 13 Bus, S. and J.E.Gibson:
Lipid peroxydation and its role in toxicology pp. 125 - 149 in: Reviews in biochemical toxicology.
Hrsg.: E.Hodgson, J.R.Bend and R.M.Philpot
New York, Elsevier North Holland Inc. 1979
- 14 Cadet, J. and R.Teoule:
Comparative study of oxidation of nucleic acid components by hydroxyl radicals, singlet oxygen and superoxide anion radicals.
Photochem.Photobiol. 28, 661 - 667 (1978)
- 15 Cadet, J. and R.Teoule:
Molecular aspects of chemical radiosensitization.
J.Radiat.Res. 18, 93 - 101 (1977)

- 16 Chapman, J.D. and A.D.Reuvers:
The time-scale of radioprotection in mammalian cells.
pp. 9-18 in: Radioprotection
Hrsg.: A.Locker and K.Flemming, Basel and Stuttgart,
Birkhauser Verlag 1977
- 17 Clarkson, J.M.:
Enhancement of repair replication in mammalian cells
by hydroxurea.
Mutat.Res. 52, 273 - 284 (1978)
- 18 Cleaver, J.E.:
Methods for studying excision repair of DNA damages
by physical and chemical mutagens.pp. 19-48 in:
Handbook of mutagenicity test procedures. Hrsg.:E.
Kilbey,Elsevier / North-Holland Biomedica Press 1977
- 19 Cleaver, J.E. and H.J.Evans:
Unscheduled DNA synthesis in human leucocytes after
exposure to UV light, X-rays and chemical mutagens.
Mutat.Res. 37, 334 - 348 (1969)
- 20 Coetzee, M.L., R.Chou and P.Ove:
Selective response of DNA polymerase β to bleomycin-
induced breaks in DNA.
Cancer Res. 38, 3621 - 3627 (1978)
- 21 Collins, A.R.S., S.L.Schor and R.T.Johnson:
The inhibition of repair in UV irradiated human
cells.
Mutat.Res. 42, 413 - 432 (1977)
- 22 Copeland, E.S.:
Mechanisms of Radioprotection - a review.
Photochem.Photobiol. 28, 839 - 844 (1978)
- 23 Criborn, C.D. and C.Rönnbäck:
Pharmacologic effects of radiation protective
compounds related to their protective effect in
mice.
Acta Radiol.Oncol. 18, 31 - 44 (1979)
- 24 De Sesso, J.M.:
Cell death and free radicals: A mechanism for
hydroxyurea teratogenesis
Medical Hypotheses 5, 937 - 951 (1979)

- 25 Doniger, J.:
DNA replication in ultraviolet light irradiated chinese hamster cells: the nature of replicon inhibition and post-replication repair.
J.Mol.Biol. 120, 433-446 (1978)
- 26 Donofrio, J.C., J.Meier and J.J.Hutton:
Nucleotide metabolism and nucleic acid synthesis in mouse thymocytes.
Cell.Immunol. 42, 79-89 (1979)
- 27 Donovan, P.J. and J.A.Dipaolo:
Caffeine enhancement of chemical carcinogen induced transformation of cultured syrian hamster cells.
Cancer Res. 34, 2720 (1974)
- 28 Downes, C.S., A.R.S.Collins and R.T.Johnson:
DNA damage in synchronized Hela cells irradiated with ultraviolet.
Biophys.J. 25, 129-150 (1979)
- 29 Dunn, W.C. and J.D.Regan:
Inhibition of DNA excision repair in human cells by arabinofuranosylcytosine: Effect on normal and xeroderma pigmentosum cells.
Mol.Pharmacol. 15, 367-374 (1979)
- 30 Edwards, D.J.:
Mechanism of antimicrobial action of metronidazole.
J.Antimicrob.Chemother. 5, 499-502 (1979)
- 31 Francis, A.A., R.D.Blevins, W.L.Carrier, D.P.Smith and J.D.Regan:
Inhibition of DNA repair in ultraviolet irradiated human cells by hydroxyurea.
Biochim.Biophys.Acta 563, 385-392 (1979)
- 32 Friedlos, F. and J.Roberts:
Caffeine-inhibited DNA repair in 7-Bromomethyl-benz(a)-anthracene-treated chinese hamster cells: Formation of breaks in parental DNA and inhibition of ligation of nascent DNA as a mechanism for enhancement of lethality and chromosome damage.
Mutat.Res. 50, 263-275 (1978)

- 33 Gabbay, E.J. and W.D.Wilson:
Intercalating agents as probes of chromatin structure.
Methods Cell Biol. 18, 351 - 383 (1978)
- 34 Geraci, J.P., G.M.Christensen and K.L.Jackson:
A defect in RNA metabolism preceding radiation-induced interphase death of thymocytes.
Radiat.Res. 58, 74 - 82 (1974)
- 35 Goutier, R. and L.Baugnet-Mathieu:
Action of SH-containing radioprotectors on nucleic acid metabolism.
pp. 445 - 451 in:
Radiation damage and sulfhydryl compounds.
Wien, Int.Atomic Energy Agency 1969
- 36 Griffiths, T.D., J.G.Carpenter and D.B.Dahle:
DNA synthesis and cell survival after X-irradiation of mammalian cells treated with caffeine or adenine.
Int.J.Radiat.Biol. 33, 493 - 505 (1978)
- 37 Hähn, J., U.Prösch und G.Siegel:
Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus von schwefelhaltigen Strahlenschutzsubstanzen.
"Isotopenpraxis" 6, 241 - 248 (1970)
- 38 Haidle, W. and R.S.Lloyd:
Action of bleomycin on DNA.
pp. 21 - 33 in: Bleomycin:Current Status and New Developments
Hrsg.: St.K.Carter, St.T.Crooke, H.Umezawa
New York, Academic Press 1978
- 39 Heim, F. und P.Mitznegg:
Die radioprotektive Wirkung des Cysteamins auf die DNA-Synthese und den DNA-Gehalt der Leber in Abhängigkeit vom Alter.pp. 107 - 120
in: Alterstheorien, Gießener Symp.Exp.Gerontol., 3 rd. 1975 Hrsg.:D.Platt
Stuttgart, Schattauer Verlag 1976
- 40 Hiss, E. and R.J.Preston:
The effect of cytosine arabinoside on the frequency of single-strand breaks in DNA of mammalian cells following irradiation or chemical treatment.
Biochim.Biophys.Acta 478, 1 - 8 (1977)

- 41 Jonker, L.S. and J. Blok:
Evidence against clustering of thymine dimers in
ultraviolet-irradiated DNA.
Nature 255, 245 - 247 (1975)
- 42 Kakunaga, T.:
Caffeine inhibits cell transformation by 4-nitro-
quinoline-1-oxyl.
Nature 258, 248 (1975)
- 43 Karlson, P.:
7. Nucleinsäuren und Proteinbiosynthese. p. 114 in:
Biochemie, Stuttgart, Georg Thieme Verlag 1979
- 44 Kendall, P.A. and D. Hutchins:
The effect of thiol-compounds on lymphocytes stimu-
lated in culture.
Immunology 35, 189 - 201 (1978)
- 45 Knight, R.C., J.M. Skolimowski and D.J. Edwards:
The interaction of reduced metronidazole with DNA.
Biochem. Pharmacol. 27, 2089 - 2093 (1978)
- 46 Kraupp, O.:
Pharmakodynamische Beeinflussung der Rhythmik, Dyna-
mik und Durchblutung des Herzens. pp. 165 - 225 in:
Pharmakologie und Toxikologie
Hrsg.: W. Forth, D. Henschler und W. Rummel
2. Aufl. Mannheim, Wien, Zürich
Bibliographisches Institut - Wissenschaftsverlag 1977
- 47 Kuhlmann, W., H.G. Fromme, E.M. Heege and W. Ostertag:
The mutagenic action of caffeine in higher organism.
Cancer Res. 28, 2375 (1968)
- 48 Kuhnlein, U., S.S. Tsang and J. Edwards:
Characterisation of DNA damages by filtration
through nitrocellulose filters: A simple probe for
DNA-modifying agents.
Mutat. Res. 64, 167 - 182 (1979)
- 49 Lafleur, M.V., J. Woldhuis and H. Loman:
Effects of sulphhydryl compounds on the radiation
damage in biologically active DNA.
Int. J. Radiat. Biol. 37, 493 - 498 (1980)

- 50 Lambert, B., A.Lindblad and U.Ringborg:
Absence of genotoxic effects of metronidazole and two of its metabolites on human lymphocytes in vitro.
Mutat.Res. 67, 281 - 287 (1979)
- 51 Lehmann, A.R. and S.Stevens:
A rapid procedure for measurement of DNA repair in human fibroblasts and for complementation analysis of xeroderma pigmentosum cells.
Mutat. Res. 69, 177 - 190 (1980)
- 52 Lehnert, S.:
Relationship of cyclic AMP levels to duration of radiation-induced mitotic delay.
Int.J.Radiat.Biol. 36, 417 - 422 (1979)
- 53 Lehnert, S.:
Radioprotection of mouse intestine by inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase.
Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys. 5, 825 - 833 (1979)
- 54 Lelièvre, P., J.R.Maisin and Z.M.Bacq:
Distribution, Metabolism and Excretion (of sulfur - containing radioprotective agents).
Int.Encycl.Pharmacol.Ther. 19, 161 - 203 (1975)
- 55 Magdon, E. und E.Schröder:
Der Einfluß von Metronidazol auf die Überlebensrate ganzkörperbestrahlter Mäuse und die DNS-Repairsynthese von Lymphozyten.
Radiobiol.Radiother. 4, 459 - 468 (1978)
- 56 Maisin, J.R. and Z.M.Bacq:
Toxicity (of sulfur-containing radioprotective agents).
Int.Encycl.Pharmacol.Ther. 19, 15 - 57 (1975)
- 57 Mattern, M.R. and R.B.Painter:
Dependence of mammalian DNA replication on DNA supercoiling.
I. Effects of ethidium bromide on DNA synthesis in permeable chinese hamster ovary cells.
Biochim.Biophys.Acta 563, 293 - 305 (1979)

- 58 Melzer, M.S.:
A re-evaluation of evidence for carcinogen-induced DNA "repair" synthesis.
Chem.-Biol.Interactions 22, 359 - 363 (1978)
- 59 Messerschmidt, O.:
Chemische Strahlenschutzsubstanzen (gegenwärtiger Stand der Forschung, Anwendungsmöglichkeiten und deren Grenzen).
pp. 104 - 114 in: Strahlenschutz in Forschung und Praxis Band XVII. Hrsg.: L.Rausch, O.Messerschmidt, G.Möhrle, R.Zimmer. Stuttgart, Thieme-Verlag 1977
- 60 Meyn, R.E.:
Effects of ultraviolet irradiation on the rate and sequence of DNA replication in synchronized chinese hamster cells.
Biophys.J. 16, 517 - 525 (1976)
- 61 Misra, H.P.:
Reaction of copper - zinc superoxide dismutase with diethyldithiocarbamate.
J.Biol.Chem. 254, 11623 - 11628 (1979)
- 62 Mitznegg, P. and M.Säbel:
Relationship between cysteamine-induced mitotic inhibition and radioprotective effects in the liver of young and senile white mice.
Int.J.Radiat.Biol. 24, 329 - 337 (1973)
- 63 Miyata, Y., A.Hagiwara, T.Nakatsuka, G.Murasaki, M.Arai and N.Ito:
Effects of caffeine and saccharin on DNA in the bladder epithelium of rats treated with N-butyl-N-(3-carboxypropyl)-nitrosamine.
Chem.-Biol. Interact. 29, 291 - 302 (1980)
- 64 Modig, H.G., M.Edgren and L.Révész:
Effects of radioprotective aminothiols on the induction and repair of single-stranded breaks in the DNA of irradiated mammalian cells.
Acta Radiobiol.Ther.Phys.Biol. 16, 245 - 256 (1977)
- 65 Mollet, P.:
Reparatur in lebenden Zellen.
Bild Wiss. 4, 70 - 78 (1977)

- 66 Momparler, R.L.:
A model for the chemotherapy of acute leukemia with
1- β -arabinofuranosylcytosine.
Cancer Res. 34, 1775-1784 (1974)
- 67 Mori, T., M.Morikawa, O.Nikaido and T.Sugahara:
Comparative studies on protective effects of various
sulfhydryl compounds against cell death and DNA
strand breaks induced by X-rays in cultured mouse
L-cells.
J.Radiat.Res. 19, 319-335 (1978)
- 68 Müller, E.G., A.Maidhof, J.Arendes, W.Geurtsen, R.K.Zahn
and R.Schmidseder:
Additive effects of bleomycin and neocarzinostatin
on degradation of DNA, inhibition of DNA polymerase
 β , and cell growth.
Cancer Res. 39, 3768-3773 (1979)
- 69 Müller, E.G. and R.K.Zahn:
Bleomycin, an antibiotic that removes thymine from
double-stranded DNA.
Progr.Nucl.Acid Res.Mol.Biol. 20, 21-57 (1977)
- 70 Nakano, S., H.Yamagami and R.Takaki:
Enhancement of excision-repair efficiency by con-
ditioned medium from density-inhibited cultures
in V79 chinese hamster cells. Evidence for excision
repair as an error-free repair process.
Mutat.Res. 62, 369-381 (1979)
- 71 Nordenson, I.:
Effects of superoxide dismutase and catalase on
radiation-induced chromosome aberrations: Dose and
cell cycle dependence.
Hereditas 89, 163-167 (1978)
- 72 Oberley, L.W. and G.R.Buettner:
Role of superoxyde dismutase in cancer: A review.
Cancer Res. 39, 1141-1149 (1979)
- 73 Olive, P.L.:
Inhibition of DNA synthesis by nitroheterocycles.
Br.J.Cancer 40, 89-104 (1979)

- 74 Okada, S. and S.Sawada:
Cysteamin and radiation-induced single strand breaks
of DNA in cultured mammalian cells.
Radiat.Res. 44, 116-132 (1970)
- 75 Orekhov, A.N., N.L.Safraz'yan, Y.Y.Chirkov, V.V.Tertov
and A.S.Sobolev:
Postradiation disturbances in the cyclic AMP system
of lymphocytes of the mouse spleen and thymus.
Bull.Exp.Biol.Med. 85, 157-160 (1978)
- 76 Ove, P. and M.L.Coetzee:
A difference in bleomycin induced DNA synthesis be-
tween liver nuclei from mature and old rats.
pp. 363-375 in: Mechanisms of Ageing and Develop-
ment, Lausanne, Elsevier Sequoia S.A. 1978
- 77 Painter, R.B.:
Rapid test to detect agents that damage human DNA.
Nature 265, 650-651 (1977)
- 78 Petkau, A.:
Radiation protection by superoxyde dismutase.
Photochem.Photobiol. 28, 765-774 (1978)
- 79 Phelps, T.A. and N.M.Blacked:
Protection of intestinal damage by pretreatment
with cytarabine (cytosine arabinoside).
Int.J. Radiat. Oncol.Biol.Phys. 5, 1617-1620 (1979)
- 80 Pitra, Ch., J.Körner, W.Malz, K.Schwarz and H.Abel:
Effects of some agents on DNA repair processes,
survival and mutagenesis in X-irradiated mammalian
cells.
Stud.Biophys. 61, 81-88 (1977)
- 81 Pitra, Ch., M.Hartwig, J.Körner and W.Malz:
Radioprotective action of cysteamin:
Primary DNA lesions, cell survival and mutation
frequency.
Stud.Biophys. 62, 31-43 (1977)

- 82 Povirk, L.F. and R.B.Painter:
Rate of DNA chain elongation in ultraviolet light-irradiated mammalian cells as estimated by a bromodeoxyuridine photolysis method.
Biophys.J. 16, 883 - 889 (1976)
- 83 Preston, R.J.:
The effect of cytosine arabinosid on the frequency of X-ray-induced chromosome aberration in normal human leucozytes.
Mutat.Res. 69, 71 - 79 (1980)
- 84 Rajewsky, M.F., D.F. Hülser und E.Fabrizius:
Untersuchungen zur Synchronisation in vivo:
Temporäre Inhibition der DNA-Synthese durch Hydroxyharnstoff in normalen und malignen Säuger-zellsystemen.
Z.Krebsforsch. 76, 266 - 292 (1971)
- 85 Rashid, A. and W.Sauerbier:
Effects of ultraviolet irradiation and postirradiation incubation on heterogeneous nuclear RNA size in murine cells.
Biophys.J. 22, 393 - 411 (1978)
- 86 Rauth, A.M.:
Evidence for dark-reactivation of ultra-violet light damage in mouse L-cells.
Radiat.Res. 31, 121 (1967)
- 87 Reichard, P.:
From desoxynucleotides to DNA synthesis.
Fed.Proc. 37, 9 - 14 (1978)
- 88 Rigas, A., C.Egnitis-Rigas and C.Head:
Biphasic toxicity of diethyldithiocarbamate, a metal chelator, to T-lymphocytes and polymorphonuclear granulocytes; reversal by Zinc and copper.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 88, 373 - 379 (1979)
- 89 Roberts, J., F.Friedlos, H.W.Van der Berg and D.J. Kirkland:
Inhibition by caffeine of post-replication repair in chinese hamster cells treated with 7-bromo-methylbenz(a)-anthracene: enhancement of toxicity, chromosome damage and inhibition of ligation of newly-synthesized DNA.
Chem.-Biol.Interactions 17, 265 - 290 (1977)

- 90 Schmerold, I.:
Mechanismen der Aktivierung einer Zellkern-DNAase
II der Rattenleber nach akuter Schädigung durch
Diäthylnitrosamin.
Diss.med.vet. München 1978
- 91 Seki, S., H.Misumi, T.Tanaka, Y.Kanzaki and T.Oda:
Effects of some polyamines, polyanions and anti-
tumor drugs on replicative DNA synthesis and un-
scheduled DNA synthesis in vitro.
Acta Med.Okayama 33, 149-156 (1979)
- 92 Seki, S. and T.Oda:
Inhibition of replicative DNA synthesis and in-
duction of unscheduled DNA synthesis in permeable
sarcoma cells by bleomycin.
Biochim.Biophys.Acta 521, 520 - 528 (1978)
- 93 Siedlecki, J.A., J.Szysko, I.Pietrzykowska and
B.Zmudzka:
Evidence implying DNA polymerase β function in
excision repair.
Nucl.Acids Res. 8, 361 - 375 (1980)
- 94 Siegel, G.:
Chemischer Strahlenschutz (Fortschrittsbericht).
"Kernenergie" 22, 337 - 340 (1979)
- 95 Siegel, G., E.Tapp, J.Hähn, H.Hannig, R.Dlaske und
E.Schneefeld:
Stand und Entwicklungstendenzen des chemischen
Strahlenschutzes.
Literaturstudie 1973
Staatliches Amt für Atomsicherheit und Strahlen-
schutz (DDR)
Report SAAS - 176 (1975)
- 96 Siegel, G., E.Tapp, J.Hähn, H.Hannig und R.Dlaske:
Stand und Entwicklungstendenzen des chemischen
Strahlenschutzes.
Literaturstudie 1974
Staatliches Amt für Atomsicherheit und Strahlen-
schutz (DDR)
Report SAAS - 195 (1976)

- 97 Siegel, G., E.Tapp, J.Hähn, H.Hannig, R.Dlaske und K.Martinek:
Stand und Entwicklungstendenzen des chemischen Strahlenschutzes.
Literaturstudie 1976
Staatliches Amt für Atomicherheit und Strahlenschutz (DDR)
Report SAAs - 221 (1977)
- 98 Sinclair, K.:
Modification of cell cycle response of synchronous mammalian cells to ionizing radiation by inhibitors of repair.
Cold Spring Harbor Conf.Cell Proliferation 1, 985 - 994 (1974)
- 99 Sognier, M., W.N.Hittelman and P.N.Rao:
The repair of bleomycin-induced DNA damage and its relationship to chromosome aberration repair.
Mutat.Res. 62, 517 - 527 (1979)
- 100 Spangler, M., G.P.Sartiano and M.L.Coetze:
Effect of bleomycin on ³H - thymidine-5'-triphosphate incorporation into host liver and hepatoma nuclei.
Cancer Res. 36, 1339 - 1346 (1976)
- 101 Stone, D., P.S.Lin and L.Kwock:
Radiosensitization of human erythrocytes by diethyl-dithiocarbamate.
Int.J.Radiat.Biol. 33, 393 - 396 (1978)
- 102 Strauss, B.:
Mechanisms of DNA excision repair in human cells.
Polycyclic Hydrocarbons and Cancer 2, 177 - 201 (1978)
- 103 Tempel, K.:
Unprogrammierte DNA-Synthese (DNA-Reparatur) in Milz- und Thymuszellen der Ratte nach Einwirkung von UV-Licht, Röntgenstrahlen oder Methylmethansulfonat in vitro.
Z.Naturforsch. 35, 106 - 111 (1980)

- 104 Van der Schans, G.P., H.B.Centen and P.H.M.Lohman:
The induction of gamma-endonuclease-susceptible sites by X-rays in CHO-cells and their cellular repair are not affected by the presence of thiol compounds during irradiation.
Mutat.Res. 59, 119 - 122 (1979)
- 105 Wawra, E. and I.Dolejs:
Evidences for function of DNA-polymerase β in unscheduled DNA synthesis.
Nucl.Acids Res. 7, 1675 - 1686 (1979)
- 106 Yew, F., F.-H. and R.T.Johnson:
Ultraviolet-induced DNA excision repair in human B- and T-lymphocytes
II. Effect of inhibitors and DNA precursors.
Biochim.Biophys.Acta 562, 240 - 251 (1979)
- 107 Yoshida, M.:
Repair of single DNA-strand breaks and recovery from sublethal radiation injury.
Kobe J.Med.Sci. 24, 31 - 47 (1978)
- 108 Youngs, D.A. and K.C.Smith:
Genetic control of multible pathways of postreplicational repair of Escherichia coli K-12.
J.Bacteriol. 125, 102 - 110 (1976)
- Nachtrag:
- 109 Apfelzweig, R.A. and R.L.Teplitz:
A study of the effect of caffeine upon excision repair of damaged DNA.
Mutat.Res. 62, 151 - 158 (1979)
- 110 Grau, H. und P.Walter:
Grundriß der Histologie und vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere.
Berlin/Hamburg, Paul Parey Verlag 1967

Lebenslauf

Julian Winkle	geb. am 12. Juli 1951 in Memmingen
Eltern	Helmut Winkle, Dipl.Ing. Marianne Winkle geb. Hausner
Volksschule	von 1957 - 1961 an der Volksschule Altenstadt/Iller
Oberschule	von 1961 - 1971 am Kolleg der Schul- brüder Illertissen Reifeprüfung 1971
Hochschule	von 1971 - 1973 Maschinenbaustudium an der Technischen Universität München, 1973 - 1978 Studium der Veterinärmedizin an der Universität München Staatsexamen 7. Dezember 1978
Approbation	1979
Dissertation	seit Januar 1979

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr.K.Tempel,
der diese Arbeit betreute und mit großem Ent-
gegenkommen Anregungen für ihren Fortgang gab.

